



**FABÍOLA MARIA ESTUDO DE FACTORES DE CONSERVAÇÃO DA
SIMÕES REI DA SILVA BOLOTA DOCE PARA A ALIMENTAÇÃO HUMANA.
MATOS**



**FABÍOLA MARIA
SIMÕES REI DA SILVA
MATOS** **ESTUDO DE FACTORES DE CONSERVAÇÃO DA
BOLOTA DOCE PARA A ALIMENTAÇÃO HUMANA.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo, Professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

aos meus pais
ao Paulo
à Módio – Biotecnologia Alimentar, Lda

o júri

presidente

Prof. Doutor José António Teixeira Lopes da Silva
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa
professora catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade
Técnica de Lisboa

Prof.^a Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
professora associada com Agregação do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

agradecimentos

Quero agradecer a todos os que colaboraram na realização deste trabalho.

À Doutora Ivonne Delgadillo, como orientadora da dissertação pelo espírito crítico construtivo e amizade.

Às pessoas que interagiram comigo em momentos da prática laboratorial, Doutora Carla Nunes e colegas, Flávia, Manuela, Sandra Fidalgo, Elisabete, Cláudia e Regina.

À minha especial amiga Ana Isabel Guerreiro e seu Tio que me facultaram a colheita da bolota doce.

Um especial agradecimento aos meus pais e irmão pelo amor e paciência que demonstraram ao longo do curso.

palavras-chave

bolota, açúcares totais, taninos, polifenóis, digestibilidade proteica, antioxidante

resumo

O desenvolvimento de um produto alimentar para o consumo humano traz vantagens ao aumentar o seu tempo de conservação, preservando as características bioquímicas, nutricionais e organolépticas que o caracterizam.

As bolotas foram aquecidas a 100°C e 50°C em fases de 10 minutos com troca de água entre cozeduras. As bolotas foram congeladas até a sua análise ou processamento.

Foram estudados: os polifenóis, os taninos e os açúcares totais presentes na bolota doce nas várias fases de cozedura. Igualmente foram analisadas as modificações da actividade antioxidante e da digestibilidade proteica em função do processamento.

A bolota cozida com pele a 50°C em 2 fases de 10 minutos obteve melhores resultados para ser seleccionada para congelar a longo prazo. Apresentou baixo teor em taninos (0.1075 µg equivalentes de ácido tânico /mg) e açúcares (42.8 µg/mg), preservou uma quantidade significativa de polifenóis (5.7 µg equivalentes de ácido tânico /mg) e apresentou valores incrementados de actividade antioxidante (21.0 µM equivalentes de Trolox/mg) e de digestibilidade proteica (13.90 %).

As bolotas que apresentaram melhores características em função das análises realizadas foram utilizadas para elaborar pão, o qual foi caracterizado e submetido a uma prova de aceitação.

keywords

acorn, total sugar, tannin, polyphenols, digestibility protein, antioxidant

abstract

The food product development for human consumption is advantageous to increase its shelf life, preserving the characteristic biochemical, nutritional and organoleptic properties.

The acorns were heated at 100 ° C and 50 ° C in steps of 10 minutes with an exchange of water from cooking. The acorns were frozen until their analysis or processing. Were studied: total polyphenols, tannins and sugars present in sweet acorn in various stages of cooking. Also analyzed the changes in antioxidant activity and protein digestibility in function of processing.

The acorn was cooked with the skin to 50 ° C in 2 phases of 10 minutes obtained better results to be selected for long-term freeze. This showed a low content in tannins (0.1075 µg tannic acid equivalents/ mg) and sugars (42.8 µg / mg) enhanced the protein digestibility (13.90%) and antioxidant activity (21.0 µM of Trolox equivalents/ mg) to preserve a significant amount of polyphenols (5.7 µg tannic acid equivalents/ mg) of dry acorn.

The acorns that showed the best characteristics as a function of the tests conducted were used to produce bread, which was characterized and subjected to a proof of acceptance.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Relevância da bolota na dieta humana.....	2
1.3 Estrutura do fruto bolota	3
1.4 Composição química da bolota.....	4
1.4.1 Polifenóis.....	5
1.4.1.1 Componentes com acção antioxidante.....	6
1.4.2 Taninos.....	7
1.4.2.1 Efeito sobre a digestibilidade proteica.....	10
1.4.3 Açúcares totais.....	11
1.4.4 Amido.....	12
1.5 Produção de pão de trigo e os processos químicos envolvidos.....	13
II. OBJECTIVOS.....	17
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Obtenção da matéria-prima	19
3.1.1 Apanha da bolota doce.....	19
3.1.2 Armazenamento da bolota.....	19
3.1.3 Selecção das bolotas.....	19
3.1.4 Determinação do rendimento de bolota utilizável.....	20
3.2 Processamento da matéria-prima.....	20
3.2.1 Descasque da bolota doce manual e congelação.....	20
3.2.2 Cozedura da bolota.....	21
3.2.2.1 Preparação da bolota cozida a 100°C.....	21
3.2.2.2 Preparação da bolota cozida a 50°C com pele	22
3.2.3 Congelação	23
3.2.4 Preparação de amostras das bolotas para determinação de taninos e açúcares.....	24
3.2.5 Preparação das águas de cozedura das bolotas	24
3.3 Métodos de análise	24

3.3.1 Determinação da humidade.....	24
3.3.2 Determinação de açúcares totais extractáveis	25
3.3.3 Determinação dos taninos.....	26
3.3.4 Determinação de polifenóis totais.....	28
3.3.5 Determinação da actividade antioxidante	30
3.3.6 Determinação da digestibilidade proteica	32
3.4 Produção do pão	33
3.5 Prova organoléptica.....	36
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Cozedura da bolota	37
4.2 Percentagem de aproveitamento da bolota doce	38
4.3 Massas das bolotas e os volumes de águas de cozedura	38
4.4 Humidade	41
4.5 Açúcares totais extractáveis.....	43
4.6 Taninos	47
4.6.1 Nas bolotas cozidas a 100°C	47
4.6.2 Nas bolotas cozidas a 50°C	49
4.7 Polifenóis e actividade antioxidante	51
4.7.1 Nas bolotas cozidas a 100°C	52
4.7.2 Nas bolotas cozidas com pele a 50°C	54
4.7.3 Polifenóis presentes nas águas de cozedura	56
4.8 Digestibilidade proteica	58
4.9 Caracterização do produto.....	61
4.10 Prova organoléptica.....	69
V. CONCLUSÃO	71
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS	73
VII. BIBLIOGRAFIA	75

Índice de Figuras

Figura 1.1: Azinheira de bolota doce.....	1
Figura 1.2: Fluxograma do processo tradicional de cozedura da bolota doce.....	3
Figura 1.3: Representação esquemática de uma bolota.....	4
Figura 1.4: Alterações que ocorrem nas proteínas.....	14
Figura 3.1: Esquema do processamento das amostras com identificação das amostras.....	21
Figura 4.1: Presença de amido no puré de bolota.....	39
Figura 4.2: Variação da tonalidade e consistência da bolota doce.....	39
Figura 4.3: Variação da tonalidade da bolota doce cozida a 100°C.....	40
Figura 4.4: Percentagens de humidade da bolota crua e das bolotas cozidas a 100°C.....	41
Figura 4.5: Percentagens de humidade da bolota crua e das bolotas cozidas a 50°C.....	42
Figura 4.6: Curva de calibração de absorvância em função da concentração de açúcares em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	43
Figura 4.7: Equivalentes de açúcares, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca, presentes na bolota crua e bolotas cozidas a 100°C.....	44
Figura 4.8: Equivalentes de açúcares, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ amostra seca, presentes nas águas de cozedura a 100°C.....	45
Figura 4.9: Equivalentes de açúcares, expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca, presentes na bolota crua e bolotas cozidas a 50°C.....	45
Figura 4.10: Equivalentes de açúcares, expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca, presentes nas águas de cozedura a 50°C.....	46
Figura 4.11: Curva de calibração de absorvância em função da concentração de ácido tânico em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para as amostras de bolota (B; B1C; B2C100; B3C100 e B1C50; B2C50), para determinação dos taninos.....	47
Figura 4.12: Curva de calibração de absorvância em função da concentração de ácido tânico em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para as amostras aquosas (A1C100; A2C100; A3C100; A1C50; A2C50; Pele; Be e Bi), para determinação dos taninos.....	47
Figura 4.13: Concentrações de taninos, expressas em equivalentes de ácido tânico em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca, presentes na bolota crua e bolotas cozidas a 100°C.....	48
Figura 4.14: Concentrações de taninos, expressas em equivalentes de ácido tânico em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca, presentes na água de cozedura das bolotas a 100°C.....	49
Figura 4.15: Concentrações de taninos expressas em equivalentes de ácido tânico em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca, presentes nas bolotas cozidas a 50°C e bolota crua.....	49
Figura 4.16: Concentrações de taninos, expressas em equivalentes de ácido tânico em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca, nas águas de cozedura a 50°C.....	50
Figura 4.17: Concentração de taninos em percentagem (%) nas fracções da bolota.....	51

Figura 4.18: Curva de calibração de absorvância em função da concentração de ácido tânico em µg/mL, para determinação dos polifenóis.....	51
Figura 4.19: Curva de calibração da absorvância em função da concentração de Trolox em µM, para determinação da acção antioxidante dos componentes da bolota.....	52
Figura 4.20: Concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca para a bolota crua e as bolotas cozidas a 100°C.....	53
Figura 4.21: Equivalentes em µM Trolox de actividade antioxidante/mg de amostra seca para a bolota crua e as bolotas cozidas a 100°C.....	53
Figura 4.22: Concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca, para as bolotas cozidas a 50°C e bolota crua.....	55
Figura 4.23: Equivalentes em µM Trolox de actividade antioxidante/mg de amostra seca, para a bolota crua e bolotas cozidas a 50°C.....	55
Figura 4.24: Concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca presente nas águas de cozedura das bolotas a 100°C.....	57
Figura 4.25: Concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca presente nas águas de cozedura a 50°C.....	58
Figura 4.26: Digestibilidade proteica expressa em percentagem (%), na bolota crua e nas bolotas cozidas a 100°C.....	59
Figura 4.27: Digestibilidade proteica expressa em percentagem (%), na bolota crua e nas bolotas cozidas a 50°C.....	60
Figura 4.28: Pão de trigo, pão de mistura com bolota B2C100, pão de mistura com bolota B2C50 e pão de bolota B2C100.....	61
Figura 4.29: Atributos para a forma dos pães.....	66
Figura 4.30: Atributos para a cor da crosta.....	66
Figura 4.31: Atributos para a textura ao corte.....	67
Figura 4.32: Atributos para o poro do miolo.....	67
Figura 4.33: Atributos para o poro do miolo.....	68
Figura 4.34: Atributos para a humidade do miolo.....	68
Figura 4.35: Atributos da prova de aceitação.....	70
Figura 5.1: Fluxograma do processo de cozedura da bolota doce.....	72

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Características morfológicas da bolota.....	2
Tabela 1.2: Composição química da Bolota (em % do fruto inteiro) em função do mês de colheita (Almeida & Marinho, 1992).....	4
Tabela 1.3: Algumas alterações que ocorrem na massa panar à medida que a sua temperatura vai aumentando	15
Tabela 3.1: Nomenclatura das Amostras.....	23
Tabela 3.2: Fórmula dos pães preparados.....	34
Tabela 3.3: Características dos pães.....	35
Tabela 4.1: Massas iniciais e finais das bolotas, e volumes de água inicial e recuperado, na cozedura das bolotas a 100°C, durante fases de cozedura de 10 minutos.....	38
Tabela 4.2: Massas iniciais e finais das bolotas, e volumes de água inicial e recuperado na cozedura das bolotas a 50°C durante fases de cozedura de 10 minutos.....	40
Tabela 4.3: Percentagens de humidade das diferentes bolotas.....	41
Tabela 4.4: Concentrações de açúcares, em µg/mg de amostra seca, presentes nas diferentes bolotas e nas águas de cozedura.....	43
Tabela 4.5: Concentrações de taninos expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca, presente nas diferentes bolotas e águas de cozedura.....	48
Tabela 4.6: Concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg e capacidade antioxidante em equivalentes µM Trolox/mg de amostra seca, para a bolota crua e as bolotas cozidas a 100°C.	52
Tabela 4.7: Concentrações de polifenóis, expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg e capacidade antioxidante em equivalentes µM Trolox/mg de amostra seca, para as bolotas cozidas a 50°C.....	54
Tabela 4.8: Concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca presente nas águas de cozedura das bolotas.....	56
Tabela 4.9: Percentagens da digestibilidade proteica nas diferentes bolotas.....	59
Tabela 4.10: Número de pessoas que assinalaram com uma cruz os atributos que acharam corresponder ao produto (pão de trigo).....	62
Tabela 4.11: Número de pessoas que assinalaram com uma cruz os atributos que acharam corresponder ao produto (pão de bolota B2C100).....	63
Tabela 4.12: Número de pessoas que assinalaram com uma cruz os atributos que acharam corresponder ao produto (pão de trigo com bolota B2C100 (9:1)).....	64
Tabela 4.13: Número de pessoas que assinalaram com uma cruz os atributos que acharam corresponder ao produto (pão de trigo com bolota B2C50 (9:1)).....	65
Tabela 4.14: Resultados da prova de aceitação com escala hedónica para os 4 tipos de pão elaborados.....	69

Lista de abreviaturas

ABTS⁺ – Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico

B – Bolota crua

B1C – Bolota da 1ª cozedura a 100°C (com pele)

B2C100 – Bolota da 2ª cozedura a 100°C (sem pele)

B3C100 – Bolota da 3ª cozedura a 100°C (sem pele)

A1C100 – Água da 1ª cozedura antes de tirar a pele a 100°C

A2C100 – Água da 2ª cozedura da bolota sem pele a 100°C

A3C100 – Água da 3ª cozedura da bolota sem pele a 100°C

B1C50 – Bolota da 1ª cozedura a 50°C (com pele)

B2C50 – Bolota da 2ª cozedura a 50°C (com pele)

A1C50 – Água da 1ª cozedura da bolota com pele a 50°C

A2C50 – Água da 2ª cozedura da bolota com pele a 50°C

Be – Parte externa da bolota

Bi – Parte interna da bolota

Tr – Trigo

I . INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A bolota é o fruto produzido pela azinheira, pelo carvalho e pelo sobreiro, árvores da família das Fagáceas (género *Quercus*). Existem vários nomes vulgares para as bolotas, que diferem da árvore que as produz e da quantidade de taninos presente na bolota (Clémence, 1995). A bolota doce é o fruto de Azinheira *Quercus rotundifolia*. Esta árvore mediterrânica normalmente tem copa redonda e chega a medir de 8 a 15 metros (Oliveira *et al.*, 2007).



Figura 1.1: Azinheira de bolota doce. Fotografia tirada no dia da apanha da bolota (Castro Verde).

As características morfológicas da bolota *Quercus rotundifolia* são expressas na tabela seguinte (Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008; Castro, 2009):

Tabela 1.1: Características morfológicas da bolota.

Parâmetros físicos	
Comprimento (mm)	38.1 ± 0.8 vs. 31.9 ± 0.7
Diâmetro (mm)	16.6 ± 0.4 vs. 13.9 ± 0.1
Massa da bolota	
Massa fresca (g)	6.9 ± 0.3 vs. 3.4 ± 0.1
Massa seca (g)	2.5 ± 0.2 vs. 1.7 ± 0.1

Na Península Ibérica, os frutos da azinheira servem de alimento a porcos denominados de montanheira. São estes porcos de cor preta que produzem o presunto de “pata-preta” ou “Jamón serrano” (Santos, 1984). A medicina popular atribui aos frutos da azinheira propriedades curativas para diarreias e pequenas infecções (Clémence, 1995).

1.2 Relevância da bolota na dieta humana

A literatura é fonte rica de referências ao consumo de bolota pelo Homem (Gómez *et al.* 2002). O aproveitamento da bolota como alimento por parte dos povos pré-romanos peninsulares durante a 2ª Idade do Ferro é descrito pelo autor latino, Plínio o Velho que cita: “É coisa certa que hoje em dia a bolota constitui uma riqueza para muitos povos até em tempos de paz”. Havendo escassez de cereais secam-se, escolhem-se as bolotas e amassa-se a farinha em forma de pão (Santos, 1984).

Segundo Estraban (1997), a bolota doce foi um dos alimentos principais na dieta dos Lusitanos, que para contornarem a escassez de cereais no Inverno, colhiam as bolotas no Outono e transformavam-nas em farinha para produzir pão.

Actualmente a bolota doce deixou de ser utilizada no fabrico de pão, pelos maiores custos de colheita e dificuldades de conservação (oxidação dos ácidos gordos que levam à formação de um aroma a ranço), ao invés do que tem acontecido com a produção de pão de cereais.

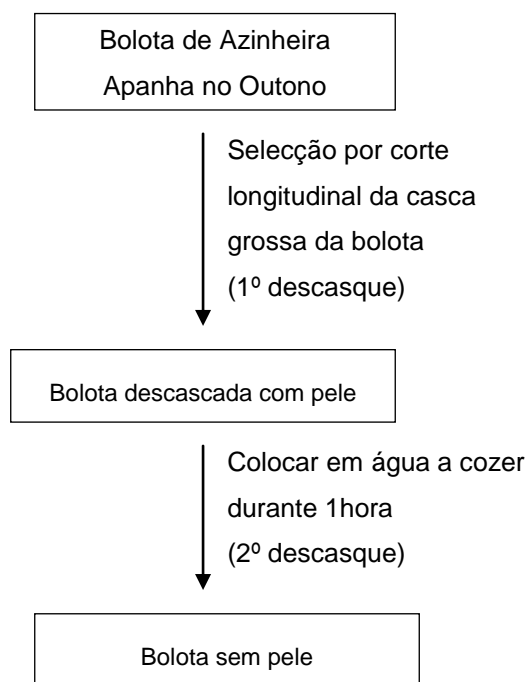


Figura 1.2: Fluxograma do processo tradicional de cozedura da bolota doce (Ciesla, 2002).

O fluxograma acima esquematizado apresenta o processo tradicional de cozedura da bolota doce para utilização em alimentação humana.

1.3 Estrutura do fruto bolota

A bolota é um pseudofruto proveniente de ovário ínfero e de pericarpo seco. A parte superior chama-se cúpula que rodeia parcialmente uma única semente que não abre – um aquénio, indeiscente e monospermico (Clémence, 1995).

A semente é constituída por casca, pele, endosperma e gérmen. A casca que envolve a semente é dura e de difícil digestão. A pele encontra-se junta ao endosperma e apresenta sabor adstringente. O gérmen encontra-se na parte da ponta fina da semente (Clémence, 1995).

As bolotas amadurecem no Outono (Outubro a Novembro) e perdem rapidamente a capacidade de germinar, por oxidação dos ácidos gordos (Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008).

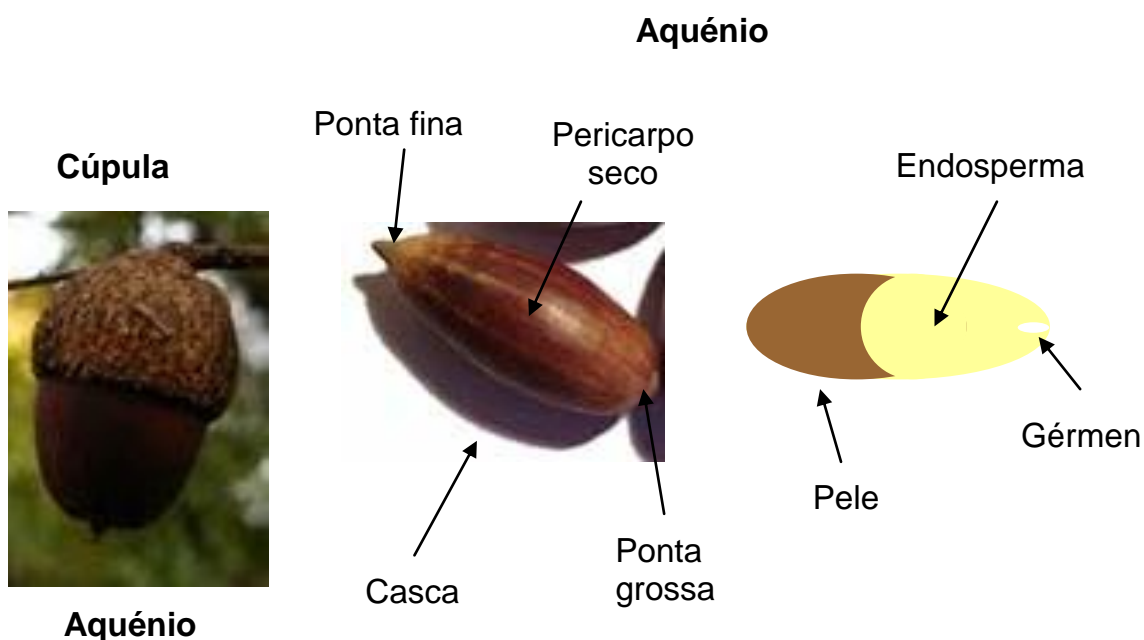


Figura 1.3: Representação esquemática de uma bolota (Clémence, 1995).

1.4 Composição química da bolota

De acordo com o grau de maturação, a bolota apresenta uma composição química variável. A tabela 1.1 apresenta essa composição química da bolota em função do mês de colheita (Almeida & Marinho, 1992).

Tabela 1.2: Composição química da Bolota (em % do fruto inteiro) em função do mês de colheita (Almeida & Marinho, 1992).

Mês de colheita	Massa Seca	Proteína Bruta	Açúcares Solúveis	Amido	Fenóis Totais	Taninos
Setembro	46.36	3.16	9.41	17.98	7.32	9.76
Outubro	53.43	3.26	10.20	51.64	7.94	7.35
Novembro	58.32	3.69	13.43	57.29	4.90	2.94

As bolotas são ricas em ácidos gordos e apresentam cerca de 63% ácido oleico e cerca de 12 a 20% de ácido palmítico e linoleico (Cantos *et al.*, 2003).

Na bolota detectou-se a presença de glucosinolatos (sintetizados a partir de aminoácidos, principalmente metionina). Estes compostos são protectores

das células e em quantidades moderadas podem ajudar a prevenir cânceros de vários tipos (Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2000).

1.4.1 Polifenóis

Compostos fenólicos são um grupo heterogêneo de substâncias naturais caracterizados por um anel aromático com um ou mais grupo hidroxilo (Bärlocher *et al.*, 2005).

Os polifenóis são geralmente divididos em taninos hidrolisáveis, fenilpropanóides, como ligninas, flavonóides (flavonois, flavonas, catequinas, isoflavonas e antocianinas) e taninos condensados (Harborne, 1980).

Segundo Cantos *et al.* (2003), na pele da bolota são encontrados elevados níveis de polifenóis.

➤ Propriedades dos polifenóis

Os compostos fenólicos possuem a propriedade de formar complexos coloridos com sais de ferro, compostos insolúveis com sais de chumbo e de sofrer substituição eletrofílica aromática de acoplamento com sais de diazônio e aldeídos, bem como formação de complexos com proteínas, tornando-as indisponíveis, e inibição de enzimas digestivas (Mesquita *et al.*, 2007).

Os polifenóis apresentam uma ampla gama de efeitos biológicos, como consequência das suas propriedades antioxidantes. Os polifenóis protegem da oxidação as LDL com consequências significativas na aterosclerose (Urquiaga, 2000).

Vários tipos de polifenóis (ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis e flavonóides) mostram efeitos anticarcinogênico e antimutagênico. Assim, os polifenóis podem interferir em vários passos que levam ao desenvolvimento de tumores malignos, inactivando-os, inibindo a expressão de genes mutantes e actividade de enzimas envolvidas na activação de pró-carcinogenes, e activar sistemas enzimáticos envolvidos na desintoxicação de xenobióticos. Vários estudos mostram que os polifenóis, flavonóides particularmente, inibem a iniciação, promoção e progressão dos tumores (Urquiaga, 2000).

➤ **Efeito da cozedura nos polifenóis**

Bressani *et al.* (1982) investigaram o destino de polifenóis durante o processo de cozedura de feijões. Os autores relataram que com a elevação da temperatura os polifenóis podem: ligar-se a algumas proteínas; serem eliminados na água de cozedura; permanecer livres; ou sofrer polimerização. Ainda foram sugeridas outras hipóteses: os polifenóis livres podem influenciar indirectamente a digestão das proteínas por inibição da actividade enzimática; durante a cozedura podem penetrar no cotilédono e reagir com as proteínas tornando-as menos susceptíveis à hidrólise enzimática.

1.4.1.1 Componentes com acção antioxidante

Entende-se por antioxidante, o composto que é capaz de, em pequenas concentrações, na presença de um substrato oxidável, retardar ou prevenir significativamente a oxidação do substrato (Soares, 1996).

Os antioxidantes podem exercer as suas propriedades protectoras em diferentes etapas do processo de oxidação e por diferentes mecanismos. Os antioxidantes "primários" interrompem a cadeia de propagação de radicais e funcionam como captadores de radicais livres ("free radical scavengers"). Os mecanismos dos antioxidantes "secundários" ou "preventivos" podem incluir a desactivação dos metais, inibição da quebra de hidroperóxidos lipídicos em produtos voláteis não desejados (Matos, 2006).

A acção de compostos antioxidantes presentes nos alimentos contendo lípidos, ou simplesmente ácidos gordos, como no caso da bolota, minimiza a rancidez, retarda a formação de produtos de oxidação tóxicos, permite manter a qualidade alimentar e aumenta o tempo de vida dos alimentos. Segundo Cantos *et al.* (2003), os polifenóis da bolota são responsáveis pela redução da oxidação lipídica dos ácidos gordos.

Os factores que influenciam a oxidação lipídica são a temperatura, luz, ar, propriedades físico-químicas do substrato e a presença de catalisadores ou inibidores de oxidação (Parejo *et al.*, 2002; Koleva *et al.*, 2002).

1.4.2 Taninos

Os taninos são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água e que na presença de proteína formam complexos tanino-proteína (Haslam, 1966). Apresentam alto peso molecular (500-3000 Da) e contém grupos hidroxilfenólicos em quantidade suficiente para permitir a formação de ligações cruzadas com proteínas (Desphande, 1986). Os taninos são classificados em dois grupos: a) taninos hidrolisáveis e b) taninos condensados ou proantocianidinas (Battestin *et al.*, 2004). Segundo Cantos *et al.* (2003), na bolota da *Quercus rotundifolia* estão presentes derivados de ácido gálico e derivados de ácido elágico. O trigaloil-hexahidrodifenoil-glucose é o principal tanino condensado encontrado no endosperma da bolota, apresenta 495.6 mg/g de bolota.

➤ Características dos taninos

As principais características dos taninos são: solubilidade em água, excepto os de elevado peso molecular; possuem a capacidade de ligar-se a proteínas, combinar-se com celulose e pectina para formar complexos insolúveis (Battestin *et al.*, 2004).

➤ Modo de acção

Os taninos são compostos fenólicos que têm a capacidade de se combinarem com as proteínas e outros polímeros como os polissacarídeos, provocando a sensação de adstringência, que não é mais que a perda do efeito de lubrificação da saliva (Prinz *et al.*, 2000).

➤ Taninos na nutrição humana

Os taninos têm um importante papel na nutrição humana, podendo exercer efeitos adversos e/ou benéficos.

O principal impacto dos taninos na nutrição humana deve-se à capacidade desses compostos em formar complexos com vários tipos de moléculas. Além

da capacidade dos taninos em precipitarem proteínas, eles também são capazes de interagir com hidratos de carbono e com iões metálicos (Nozella, 2001).

Segundo Almeida (1986) os taninos reagem com proteína formando complexos tanino-proteína insolúveis. Parecem participar, na formação de tais complexos, quatro tipos de ligações:

- ligações hidrogénio entre os grupos fenólicos do tanino e cetoimida das proteínas;
- ligações iónicas entre o anião fenolato e o sítio catiónico da molécula proteica;
- ligações covalentes formadas por oxidação dos polifenóis em quinonas e subsequente condensação com um grupo nucleofílico (-NH₂, -SH, -OH) nas proteínas;
- interacções hidrofóbicas entre a estrutura cíclica, aromática, dos compostos fenólicos e as regiões hidrofóbicas das proteínas.

➤ **Efeitos benéficos**

Os taninos ao complexarem com iões metálicos e macromoléculas, e ao apresentarem actividade antioxidante têm as seguintes aplicações farmacológicas:

- antídotos em intoxicações por metais pesados e alcalóides;
- adstringentes:
- via externa: cicatrizantes, hemostáticos e protectores;
- via interna: antidiarreicos;
- anti-sépticos;
- antioxidantes (Peris *et al.*, 1995).

➤ **Efeitos adversos**

Os taninos condensados estão presentes na fracção fibra alimentar de diferentes alimentos, como na bolota e podem ser considerados não digeríveis ou pobremente digeríveis (Bartolomé *et al.*, 1995). Os efeitos anti-nutricionais dos taninos, em geral:

- Deprime a ingestão alimentar.
- Afecta a digestibilidade:
 - Complexa-se com a proteína ou outros componentes alimentares.
 - Complexa-se com enzimas digestivas, interferindo com a digestão.
 - Complexa-se com suficiente quantidade de proteína endógena de alta qualidade.
 - Complexa-se com, ou danifica, partes do próprio tubo digestivo, interferindo com as funções.

Os seus produtos de hidrólise são absorvidos e têm efeito tóxico em qualquer ponto do organismo (Almeida, 1986).

➤ **Método de remoção**

Dado que os taninos têm efeitos negativos na alimentação humana, será desejável reduzir o seu nível ou a sua acção.

Os esforços conduzidos para dominar os efeitos antinutricionais, ou tóxicos, dos taninos dos alimentos, centram-se em várias linhas, nomeadamente (Price e Butler, 1980):

- Remoção física ou química do tanino.
- Adição à dieta de substâncias que se complexam com o tanino (adsorventes tais como a polivinilpirrolidona (PVP) e o polietilenoglicol (PEG)).
- Processamento químico do produto alimentar, para alterar o tanino *in situ*.
- Selecção de variedades de plantas com menor teor em taninos. (Almeida, 1986).

1.4.2.1 Efeito sobre a digestibilidade proteica

Os taninos interferem com a digestão enzimática das proteínas, quer pela formação de complexos insolúveis com os substratos (diminuindo assim a biodisponibilidade), quer pela inactivação de várias enzimas digestivas por um processo similar à da formação dos complexos (Almeida, 1986). Estudos conduzidos *in vitro* demonstraram que várias enzimas digestivas, nomeadamente tripsina, α -amilase e pepsina (Oh *et al.*, 1978) são inibidas pelos taninos (Almeida, 1986).

A digestibilidade da proteína é determinada em função da fracção do azoto ingerido que o indivíduo absorve. A digestibilidade verdadeira é obtida pela diferença entre azoto ingerido e aquele que aparece nas fezes corrigido pela quantidade de azoto fecal excretado quando o indivíduo consome uma dieta livre de proteína. A digestibilidade é também a medida da percentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas, na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto azotado, pelo organismo (Pires *et al.*, 2006).

Vários factores têm sido identificados que interferem na digestibilidade, dentre estes se incluem a presença de componentes biologicamente activos, processamento térmico e estrutura química da proteína. Esses factores afectam a digestibilidade da proteína, diminuindo a sua hidrólise, tornando os aminoácidos menos disponíveis para serem absorvidos pelo organismo (Pires *et al.*, 2006).

As digestibilidades são estudadas usando enzimas proteolíticas que agem normalmente na digestão (no caso pepsina), procurando-se imitar, inclusive, as condições de pH ou de acidez, características do estômago e do intestino onde a digestão das proteínas se processa (Pires *et al.*, 2006).

A pepsina é uma enzima digestiva que é produzida pelas paredes do estômago, sendo segregada no suco gástrico, e tem como função hidrolisar as proteínas em péptidos mais simples. Só reage em meio ácido, o seu pH óptimo situa-se entre 2 e 3. Por isso, o estômago também produz ácido clorídrico (HCl). Quando em contacto com o ácido clorídrico, o pepsinogénio (percursor "inactivo" que está presente no suco gástrico) transforma-se na pepsina, que é "activa".

A pepsina actua sobre proteínas no processo de quimificação, dando origem ao quimo (Stryer, 1996).

Um método de aumentar a digestibilidade proteica é: dissociar os complexos tanino-proteína, pelo menos parcialmente, com solventes orgânicos tais como: acetona, ésteres, dimetilformamida, N-metilpirridiona e dimetilsulfoxido, detergentes, processamento alcalino, cafeína e polietilenoglicol (PEG) 4 000 (Almeida, 1986). O efeito da adição de PEG (Polietilenoglicol) ao miolo da bolota aumenta a digestibilidade da proteína bruta. Os taninos têm efeito biológico sobre a digestibilidade da fracção azotada dos alimentos, tal como é referido por muitos autores (Reed, 1995).

Pode-se inibir a acção dos taninos sobre as proteínas da dieta por acção de: demolha da bolota em água, por processamento com hidróxido ou carbonato de cálcio (Nozella, 2001) e outros processos de remoção dos taninos detalhados anteriormente, desde que a bolota não se danifique como alimento (Almeida, 1986).

De uma forma geral a digestibilidade proteica é afectada pela presença de uma considerável percentagem de taninos e polifenóis na bolota. Quanto mais elevado for o teor em prolina da proteína, maior será a capacidade de se complexar com os taninos. Assim, o alto teor de prolina presente na proteína salivar pode ser considerado um processo de inactivação de taninos, já que reduz a quantidade de taninos disponíveis para se complexarem com os nutrientes, reduzindo, assim, os seus efeitos anti-nutricionais (Castro, 2009). Estes efeitos anti-nutricionais têm associados efeitos adversos como está descrito na secção dos taninos (perda de peso, diminuição da velocidade de crescimento celular, pouca retenção de nitrogénio, diminuição de energia metabolizada e baixa absorção de ferro) (Garcia, 2004).

1.4.3 Açúcares totais

Os hidratos de carbono capazes de reduzir sais de cobre e prata em soluções alcalinas, conhecidos como açúcares redutores, apresentam grupos de aldeídos ou cetónicos livres. Assim, todos os monossacarídeos são redutores e o mecanismo de oxidação-redução está relacionado com a

formação de um enediol, função fortemente redutora em meio alcalino, que interconverte aldoses e cetoses. A glucose, em meio alcalino, é rapidamente transformada em enediol, levando à formação de frutose e de manose, e este composto, conhecido como redutona, ao ser oxidado à função aldônica causa a redução dos iões cúpricos (Demiate *et al.*, 2002).

A bolota contém valores médios de 5% de açúcares (Fernández *et al.*, 2005). De acordo com Sanz *et al.* (2008) extractos aquosos de bolota apresentam 68% de *proto-quercitol* ($C_6H_7(OH)_5$), 20% de frutose e 18% de glucose. Segundo Khanbabaee *et al.* (2001) o *proto-quercitol* é um dos açúcares tal como a D-glucosepiranose que se apresenta ligado ao ácido gálico formando os galotaninos. De acordo com Sanz *et al.* (2004) estes galotaninos, taninos hidrolisáveis estão presentes no endosperma da bolota e apresentam actividade antioxidante.

O *proto-quercitol* - álcool cíclico, penta hidroxilado - é incolor, solúvel em água, cristais de sabor doce, com um ponto de fusão de 234°C e é um composto extraído das bolotas e usado na medicina (Bender, 2005). O *proto-quercitol* faz parte do grupo de inositóis, alcoóis cíclicos ou polióis. O inositol pode ajudar na redução dos níveis sanguíneos de colesterol, modulador da actividade da insulina, mantém o bom nível de neurotransmissores, aliviar a depressão, reduzir o transtorno compulsivo / obsessivo (TOC), menor pressão arterial e até mesmo ajudar a evitar queda de cabelo. Está a ser estudado como composto que previne e trata a primeira fase da Doença de Alzheimer (Merck Index, 1989).

1.4.4 Amido

O amido é o principal polissacarídeo de reserva da bolota – cerca de 70% da farinha – é constituído por dois componentes principais, amilose e amilopectina, ambos formados de unidades repetitivas de α -D-glucose. A amilose é o componente essencialmente linear, com ligações α – (1,4) entre as unidades. A amilopectina, além de possuir unidades de α -D-glucose unidas através de ligações α – (1,4), apresenta diversas ramificações, originadas por ligações do tipo α – (1,6), ao longo de toda cadeia (Van Soest *et al.* 1996).

Estas cadeias formam uma estrutura semi-cristalina, bem resistente, que se denomina grânulo.

O amido apresenta pouca capacidade de absorção de água à temperatura ambiente. Com o aumento de temperatura, a absorção de água aumenta, observando-se a solubilização da amilose e da amilopectina. A esse fenómeno, dá-se o nome de gelatinização do amido. A temperatura de gelatinização é característica da fonte de amido e pode variar entre 60°C para o amido de trigo e 72°C para o amido de milho e milho ceroso. O amido gelatinizado é susceptível à digestão pelas amilases. No arrefecimento, este amido gelatinizado sofre retrogradação (Eastwood, 2003).

1.5 Produção de pão de trigo e os processos químicos envolvidos

O miolo de uma fatia de pão é uma espuma, ou seja, uma dispersão de gás numa fase sólida. A côdea do pão é mais dura, estaladiça e com uma coloração acastanhada. Cada um dos ingredientes do pão tem o seu papel na formação destas estruturas. Os ingredientes fundamentais do pão são a farinha de trigo, a água, o sal e a levedura de padeiro.

A farinha de trigo é constituída por vários tipos de compostos, todos eles bem importantes para a qualidade final do pão, sendo os mais relevantes, o amido e as proteínas.

Nas farinhas existem as amilases que hidrolisam as cadeias do amido. Daí resultam açúcares livres que são importantes na panificação. Quanto às proteínas do trigo, elas são diferentes das dos outros cereais. Quando se adiciona água à farinha e se amassa a fracção não solúvel, constituída por dois tipos de proteínas – as gliadinas e as gluteninas – forma uma rede denominada glúten, que tem a função fundamental de reter o gás formado e permitir que o pão fique macio.

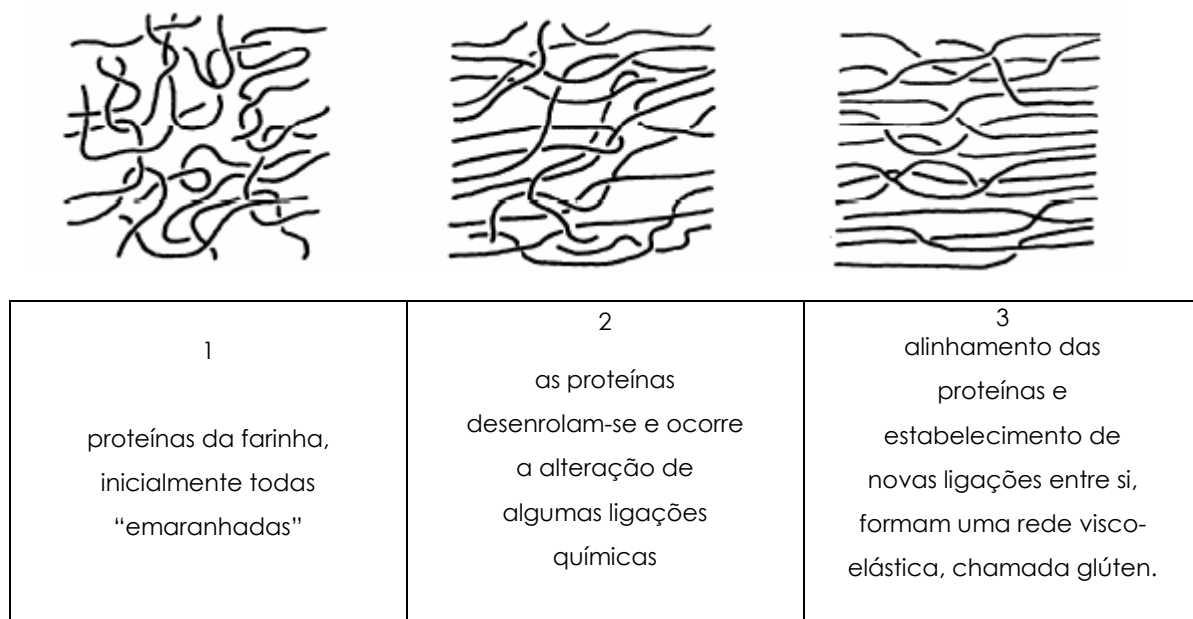


Figura 1.4: Alterações que ocorrem nas proteínas.

Na água vão-se dissolver os compostos solúveis. Por outro lado ela liga-se aos restantes componentes, nomeadamente às proteínas que vão constituir o glúten e ao amido, hidratando-os. É também necessária a todas as reacções enzimáticas.

O CO_2 produzido, pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, vai acumular-se dentro da massa, e se o glúten tiver a “força” adequada para o reter, esta vai expandir-se dada a sua elasticidade. Podendo duplicar o seu volume inicial. Quando a massa atinge o volume desejado, é metida no forno, a temperaturas entre os 170 e os 220°C, e, à medida que a massa vai aquecendo, ocorrem uma série de processos assim resumidos na tabela 1.3 (Mata *et al.*, 2010).

Tabela 1.3: Algumas alterações que ocorrem na massa panar à medida que a sua temperatura vai aumentando (Mata *et al.*, 2010).

Temperatura da massa (°C)	Alguns fenómenos que ocorrem na massa durante a cozedura
30	Aumento da actividade das leveduras com produção de gás; expansão do gás pelo calor. A massa aumenta ainda mais de volume.
50 – 60	Fim da actividade das leveduras e forte actividade enzimática.
60 – 80	Coagulação das proteínas; gelatinização do amido (grãos absorvem água e incham).
100	Evaporação de água, libertação de vapor de água e formação da côdea.
130 – 200	Escurecimento – reacções de caramelização de açúcares e reacções de Maillard entre açúcares e aminoácidos. Formação da estrutura estaladiça.

II. OBJECTIVOS

O objectivo geral deste trabalho é estudar a bolota doce como ingrediente para o sector da panificação e incrementar o uso de produtos autóctones.

Objectivos específicos:

- 1) Avaliar o processo de cozedura como potencial método para eliminação de taninos.
- 2) Avaliar a acção antioxidante de componentes da bolota crua e processada.
- 3) Caracterização do pão feito a partir de bolota pré-congelada.

De forma a se atingirem os objectivos propostos, foram analisados os componentes da bolota doce nas diversas fases de processamento. Foram quantificados os polifenóis e a sua actividade antioxidante, os taninos, os açúcares totais extractáveis existentes nas diversas amostras de bolota. Determinou-se a digestibilidade proteica. Comparou-se o pão de trigo com os pães de bolota.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1 Obtenção da matéria-prima

3.1.1 Apanha da bolota doce

A bolota apanhou-se em meados de Outono, fins de Novembro, quando estavam maduras. Com uma vara, varejou-se a azinheira e apanhou-se seleccionando a bolota intacta, sem impurezas, para dentro de sacos que facilitaram o transporte até ao local de armazenamento.

3.1.2 Armazenamento da bolota

Num local seco e arejado estendeu-se ao longo do chão as bolotas. Separou-se as bolotas umas das outras, para evitar transpiração, pela intensa actividade respiratória e consumo de energia. Estes factores podem determinar redução acentuada da disponibilidade de reservas e metabolismo desordenado, com a actividade de radicais livres que provocam prejuízos à conservação da viabilidade durante o armazenamento, pois favorecem a rápida deterioração (Andreó *et al.*, 2006). As bolotas mantiveram-se estendidas no máximo um mês, enquanto foram sendo processadas.

3.1.3 Selecção das bolotas

Depois de apanhar as bolotas no Outono, há que seleccioná-las, descascá-las e cozê-las. Devem de seguida ser congeladas a -18°C, para posterior utilização. Este processo de preparação prévia da bolota foi publicado em 2008 por PROSEPE, Projecto de Sensibilização e Educação Florestal da População Escolar.

As bolotas foram seleccionadas por observação após corte transversal da casca no lado mais grosso da bolota. Assim podem ser observadas quais as bolotas a aproveitar e a desprezar seja por contaminações microbianas ou por oxidação dos ácidos gordos. As bolotas que sofreram humedificação durante a apanha podem apresentar fungos que as danificam. Também se desprezam estas bolotas.

3.1.4 Determinação do rendimento de bolota utilizável

Pesou-se perto de 1 kg de bolotas. Cortou-se a parte grossa da casca da bolota para ver quais estavam boas e más. Pesaram-se as bolotas más e boas com casca. Pesou-se a massa das cascas grossas das boas. Calculou-se a massa de boas sem casca. Calculou-se o rendimento estimado de aproveitamento da bolota de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Aproveitamento da bolota} = 100 - \frac{\text{Massa de subprodutos}}{\text{Massa Total}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2 Processamento da matéria-prima

3.2.1 Descasque manual da bolota doce

Passos do descasque:

1. Descascaram-se as bolotas com um golpe lateral de forma a soltar a casca grossa (1º Descasque).
2. Uma parte das bolotas resultantes do 1º descasque foram raspadas, para retirar a pele da bolota. Assim, guardaram-se para as análises aproximadamente 15 g de bolotas cruas sem pele designadas por bolotas B.
3. No caso das bolotas que foram aquecidas em água destilada, foi-lhes retirada a pele após o primeiro aquecimento (2º Descasque)

Este processo manual de descasque é similar ao usado para descasque da castanha (Sousa, 2007).

3.2.2 Cozedura da bolota

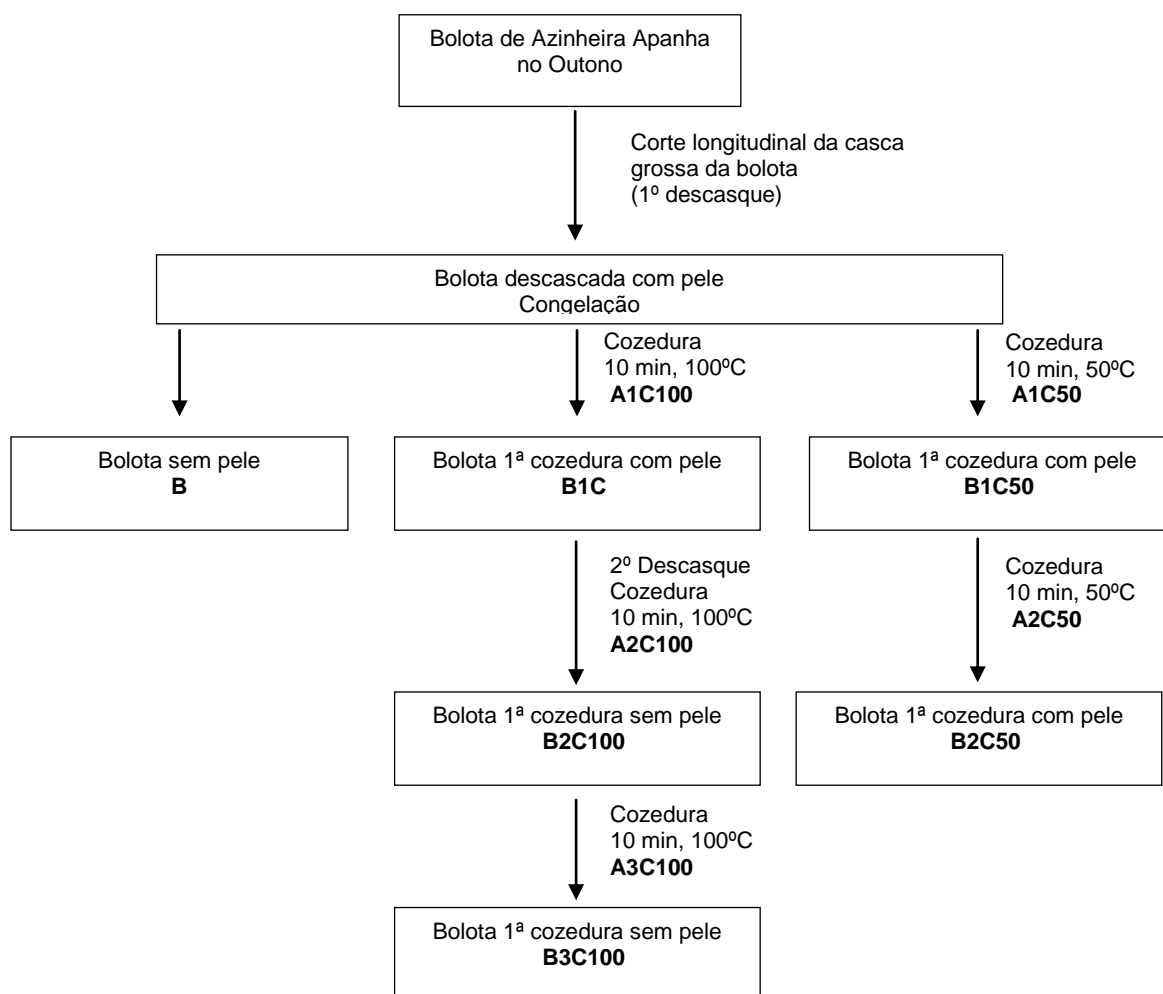


Figura 3.1: Esquema do processamento das amostras com identificação das amostras

3.2.2.1 Preparação da bolota cozida a 100°C

Bolotas B1C e água A1C100

Colocaram-se a cozer aproximadamente 500g de bolotas boas sem casca grossa em 500mL de água destilada a ferver a 100°C durante 10 minutos. Registaram-se a massa das bolotas B1C e o volume de água que sai da cozedura - A1C100. Retiraram-se amostras de bolotas da 1ª cozedura (B1C) para as análises e determinação da humidade (aproximadamente 15g). Procedeu-se ao 2º descasque. Guardou-se a água A1C100 em frascos de 50mL para congelar e posteriores análises.

Bolotas B2C100 e água A2C100

Após o 2º descasque, pesaram-se as bolotas sem pele, e colocaram-se a cozer em 400mL de água destilada a ferver a 100°C durante 10 minutos. Registaram-se a massa das bolotas B2C100 e o volume de água que sai da cozedura – A2C100. Retiraram-se amostras de bolotas da 2ª cozedura (B2C100) para as análises e determinação da humidade (aproximadamente 15g). Guardou-se a água A2C100 em frascos de 50mL para congelar e posteriores análises.

Bolotas B3C100 e água A3C100

Pesaram-se as bolotas restantes e colocaram-se a cozer em 400mL de água destilada a ferver a 100°C durante 10 minutos. Registaram-se a massa das bolotas B3C100 e o volume de água que sai da cozedura – A3C100. Retiraram-se amostras de bolotas da 3ª cozedura (B3C100) para as análises e determinação da humidade (aproximadamente 15g). Guardou-se a água (A3C100) em frascos de 50mL para congelar e posteriores análises.

3.2.2.2 Preparação da bolota cozida a 50°C com pele

Foi realizado outro ensaio de cozedura no qual o 2º descasque não foi feito.

Bolotas B1C50 e água A1C50

Colocaram-se a cozer aproximadamente 100g de bolotas boas sem casca grossa em 300mL de água destilada a ferver a 50°C durante 10 minutos. Registaram-se a massa das bolotas B1C50 e o volume de água que sai da cozedura – A1C50. Retiraram-se amostras de bolotas da 1ª cozedura (B1C50) para as análises e determinação da humidade (aproximadamente 15g). Guardou-se a água (A1C50) em frascos de 50mL para congelar e posteriores análises.

Bolotas B2C50 e água A2C50

Pesaram-se as bolotas restantes, e colocaram-se a cozer em 300mL de água destilada a ferver a 50°C durante 10 minutos. Registou-se a massa das

bolotas B2C50 e o volume de água que sai da cozedura – A2C50. Retiraram-se amostras de bolotas da 2ª cozedura (B2C50) para as análises e determinação da humidade (aproximadamente 15g). Guardou-se a água (A2C50) em frascos de 50mL para congelar e posteriores análises.

As referências das diferentes bolotas e águas de cozedura que sofreram diferentes condições de processamento são apresentadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Nomenclatura das Amostras

	Nome da referência	Temperatura de cozedura	Tempo de cozedura
B	Bolota crua sem pele	Não aplicável	Não aplicável
B1C	Bolota 1ª cozedura	100°C	10 minutos
B2C100	Bolota 2ª cozedura	100°C	10 minutos
B3C100	Bolota 3ª cozedura	100°C	10 minutos
A1C100	Água 1ª cozedura	100°C	10 minutos
A2C100	Água 2ª cozedura	100°C	10 minutos
A3C100	Água 3ª cozedura	100°C	10 minutos
B1C50	Bolota 1ª cozedura	50°C	10 minutos
B2C50	Bolota 2ª cozedura	50°C	10 minutos
A1C50	Água 1ª cozedura	50°C	10 minutos
A2C50	Água 2ª cozedura	50°C	10 minutos
Pele	Pele fina raspada crua		
Be	Bolota externa crua junto à pele	Não aplicável	
Bi	Bolota parte interna		

3.2.3 Congelação

As bolotas após o primeiro descasque e a raspagem da pele foram congeladas a -18°C em sacos de polietileno selados até à sua utilização para análise ou elaboração do pão. Passadas 12 horas de congelamento, soltam-se as bolotas dentro do saco e voltam-se a colocar na arca. Neste momento estarão prontas a ser utilizadas. Em todos os casos as bolotas foram deixadas descongelar durante 12 horas em frigorífico.

3.2.4 Preparação da amostra das bolotas para determinação de taninos e açúcares

Colocaram-se aproximadamente 2g de bolotas raladas num frasco com 50mL de água destilada. Deixaram-se em repouso 4 horas. Filtrou-se a água de extracção e guardou-se o volume filtrado (líquido translúcido) em frascos que se identificaram e congelaram para posteriores análises.

3.2.5. Preparação das águas de cozedura das bolotas

Colocaram-se 5 mL de água de cada cozedura em tubos de centrífuga. Centrifugou-se a 20,000G durante 10 minutos a 10°C. Pipetou-se o sobrenadante com cuidado sem abanar os tubos de centrífuga para ser retirado o mais translúcido possível. Se o líquido não saiu translúcido procederam-se a duas filtrações simples por gravidade. Foi obtido um líquido translúcido amarelo que decresceu de intensidade conforme o tempo de cozedura. Este líquido guardou-se em frascos identificados no congelador para posteriores análises.

3.3 Métodos de análise

3.3.1 Determinação da humidade

As cápsulas de níquel limpas e secas foram manuseadas com papel absorvente. Colocaram-se as cápsulas destapadas na estufa a 104°C durante 1 hora. Colocaram-se no exsiccador a arrefecer. Pesaram-se as amostras raladas para as cápsulas. Registaram-se os pesos totais das cápsulas com amostra e tampa. Colocaram-se as cápsulas destapadas na estufa a 104°C durante 24 h. Colocaram-se no exsiccador até arrefecer. Registaram-se os pesos totais das cápsulas com amostra e tampa. A partir da diferença entre os dois pesos totais das cápsulas com amostra e tampa inicial e final determinaram-se as massas de amostra com secagem da estufa. Assim calcularam-se as percentagens de humidade de cada bolota no seu estado de processamento.

3.3.2 Determinação de açúcares totais extractáveis

Para a determinação dos açúcares totais usou-se o Método fenol sulfúrico. Este método, segundo Dubois *et al.* (1956), fundamenta-se no facto de que açúcares simples (monossacarídeos) ou complexos (polissacarídeos), e seus derivados, incluindo metil ésteres com grupos redutores livres ou potencialmente livres, quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado dão coloração amarelo-alaranjado, com uma reacção sensível e coloração estável. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de açúcares totais presentes na amostra. O método é simples, rápido, sensível e com resultados reprodutíveis. Esta técnica dispensa hidrólise da amostra, uma vez que utiliza ácido sulfúrico concentrado (Demiate *et al.*, 2002).

Preparação de soluções:

Prepararam-se o fenol a 5% (p/v).

Preparou-se a solução padrão de glucose a 700 µg/mL, colocaram-se 0.07 g num balão volumétrico de 100 mL, preparou-se e aferiu-se com água destilada.

Preparação dos tubos de ensaio para a curva de calibração:

- 1) Identificaram-se em duplicado 11 tubos de ensaio com a referência de concentração de glucose em µg/mL: 0 (o branco); 70; 140; 210; 280; 350; 420; 490; 560; 630; 700 (os controlos), respectivamente.
- 2) Pipetaram-se 0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9; 1.0 mL de solução padrão de glucose para 11 tubos de ensaio e adicionaram-se 1.0; 0.9; 0.8; 0.7; 0.6; 0.5; 0.4; 0.3; 0.2; 0.1; 0 mL de água destilada, respectivamente.
- 3) Adicionou-se 1 mL de fenol a 5% (p/v). Deixaram-se repousar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Leu-se a absorvância a 490 nm.
- 5) Traçou-se o gráfico concentração de açúcares versus absorvância.
- 6) Traçou-se também a curva de calibração que deve ser linear.

Preparação dos tubos de ensaio para as amostras:

- 1) Identificaram-se em duplicado 11 tubos de centrífuga com a referência de símbolo da amostra: B; B1C; B2C100; B3C100; A1C100; A2C100, A3C100; B1C50; B2C50; A1C50; A2C50, respectivamente.
- 2) Para cada um dos tubos de ensaio, B; B1C; B2C100; B3C100; A1C100; A2C100, A3C100; B1C50; B2C50; A1C50; A2C50, pipetaram-se 150; 200; 200; 200; 50; 50; 50; 200; 100; 300; 300 µl de cada solução aquosa de amostras da bolota, preparadas como no ponto 3.2 da metodologia e fez-se até 1 mL com água destilada, respectivamente.
- 3) Adicionou-se 1 mL de fenol a 5% (p/v) e 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Homogeneizaram-se os tubos no vortex. Deixou-se repousar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Leu-se a absorvância a 490 nm.
- 5) Usou-se como branco a concentração de glucose em µg/mL igual a zero. E como controles as restantes concentrações de glucose em µg/mL preparadas para a curva de calibração.
- 6) Baseado na curva de calibração linear do gráfico concentração de açúcares versus absorvância, determinaram-se equivalentes de açúcares por mg de bolota, tendo em conta o volume de amostra aquosa usado no passo 2 e a percentagem de humidade.

3.3.3 Método de determinação dos taninos

Preparação de soluções:

Prepararam-se 100 mL da solução aquosa 70% de acetona (v/v).

Preparou-se a solução stock de 25 mg de ácido tânico em 100 mL de 70% acetona.

Preparou-se o reagente de vanilina (4% (w/v) de vanilina em metanol):

- Colocaram-se 4 g de NaOH num balão volumétrico de 100 mL, preparou-se e aferiu-se com metanol.

Preparação dos tubos de ensaio para as curvas de calibração:

Para a curva de calibração para as amostras aquosas (A1C100; A2C100, A3C100; A1C50; A2C50; Pele; Be e Bi):

Identificaram-se em duplicado 6 tubos de ensaio com a referência de concentração de ácido tânico em $\mu\text{g/mL}$: 0 (o branco); 2.5; 5.0; 7.5; 10.0; 12.5 (os controlos), respectivamente.

Pipetaram-se 0; 0.01; 0.02; 0.03; 0.04; 0.05 mL de solução stock para 6 tubos de ensaio e adicionaram-se 0.05; 0.04; 0.03; 0.02; 0.01; 0 mL de água destilada, respectivamente. Homogeneizou-se no vortex.

Para a curva de calibração para as amostras de bolota (B; B1C; B2C100; B3C100 e B1C50; B2C50): Identificaram-se em duplicado 6 tubos de ensaio com a referência de concentração de ácido tânico em $\mu\text{g/mL}$: 0 (o branco); 25; 50; 75; 100; 125 (os controlos), respectivamente.

Pipetaram-se 0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 mL de solução stock para 6 tubos de ensaio e adicionou-se 0.5; 0.4; 0.3; 0.2; 0.1; 0 mL de água destilada, respectivamente. Homogeneizou-se no vortex.

A cada tubo de ensaio:

- 1) Adicionaram-se 3 mL de reagente de vanilina e 1.5 mL de HCl concentrado a 37 %.
- 2) A reacção decorreu durante 15 minutos num banho à temperatura ambiente e com os tubos protegidos com papel de alumínio do efeito da luz.
- 3) A absorvância da mistura reaccional foi medida a 500 nm contra o branco de uma amostra de água.
- 4) Traçou-se o gráfico concentração de ácido tânico versus absorvância.

Traçou-se também a curva de calibração que deve ser linear.

Preparação dos tubos de ensaio para as amostras:

- 1) Identificaram-se em duplicado 14 tubos de ensaio com a referência de símbolo da amostra: B; B1C; B2C100; B3C100; A1C100; A2C100, A3C100; B1C50; B2C50; A1C50; A2C50; Pele; Bi e Be, respectivamente.
- 2) Nos tubos de ensaio (A1C100; A2C100, A3C100; A1C50; A2C50; Pele; Be e Bi) colocaram-se 50 μl de cada amostra aquosa e nos tubos de

ensaio (B; B1C; B2C100; B3C100) colocaram-se 500 µl de cada amostra aquosa de bolota, preparadas como no ponto 3.2 da metodologia.

A cada tubo de ensaio:

- 3) Adicionaram-se 3 mL de reagente de vanilina e 1.5 mL de HCl concentrado.
- 4) A reacção decorreu durante 15 minutos num banho à temperatura ambiente e com os tubos protegidos com papel de alumínio do efeito da luz.
- 5) A absorvância da mistura reaccional foi medida a 500 nm.
- 6) Usou-se como branco a concentração de ácido tânico em µg/mL igual a zero. E como controlos as restantes concentrações de ácido tânico em µg/mL preparadas para a curva de calibração.
- 7) Baseado na curva de calibração linear do gráfico concentração de ácido tânico versus absorvância, determinaram-se equivalentes de ácido tânico por mg de bolota, tendo em conta o volume de amostra aquosa usado no passo 2 e a percentagem de humidade da amostra.

3.3.4 Método de determinação dos polifenóis totais

Os polifenóis totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu.

Preparação de soluções:

Prepararam-se 200 mL de solução aquosa de 70% acetona (v / v).

Preparou-se a solução stock de 25 mg de ácido tânico em 100 mL de 70% acetona.

Solução de 0.1 N NaOH:

- Colocaram-se 0.8 g de NaOH num balão volumétrico de 200 mL, preparou-se e aferiu-se com água destilada;
- A solução de Na₂CO₃ 2% num balão volumétrico de 200 mL, preparou-se e aferiu-se com NaOH preparado anteriormente.
- Diluiu-se o reagente Folin-Ciocalteu (Fluka para preparação de soluções) 1:2 com água destilada, num balão volumétrico.

Preparação dos tubos de ensaio para a curva de calibração:

- 1) Identificaram-se em duplicado 6 tubos de ensaio com a referência de concentração de ácido tânico em $\mu\text{g/mL}$: 0; e 50; 100; 150; 200; 250, respectivamente. A concentração de ácido tânico em $\mu\text{g/mL}$ igual a zero corresponde ao branco. As restantes concentrações de ácido tânico em $\mu\text{g/mL}$ correspondem aos controlos.
- 2) Pipetaram-se 0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0 mL de solução stock para 6 tubos de ensaio e adicionou-se 1.0; 0.8; 0.6; 0.4; 0.2; 0 mL de água destilada, respectivamente. Homogeneizou-se no vortex.
- 3) Adicionaram-se 5 mL de 2% Na_2CO_3 em 0.1 N NaOH e homogeneizou-se.
- 4) Após 5 minutos, adicionaram-se 0.5 mL de Reagente Folin-Ciocalteu e homogeneizou-se.
- 5) Após 120 minutos, leu-se a absorvância a 760 nm.
- 6) Traçou-se o gráfico concentração de ácido tânico versus absorvância.
- 7) Traçou-se também a curva de calibração que deve ser linear.

Preparação dos tubos de ensaio para as amostras:

- 1) Identificaram-se em duplicado 11 tubos de centrífuga com a referência de símbolo da amostra: B; B1C; B2C100; B3C100; A1C100; A2C100, A3C100; B1C50; B2C50; A1C50; A2C50, respectivamente.
- 2) Nos tubos de amostras sólidas (B; B1C; B2C100; B3C100; B1C50; B2C50) colocaram-se 100 mg de cada amostra de bolota ralada e nos tubos de amostras aquosas, águas de cozedura (A1C100; A2C100, A3C100; A1C50; A2C50) colocou-se 1 mL de cada amostra aquosa.
- 3) Adicionaram-se 5 mL de 70% acetona aos tubos de centrífuga para extrair os compostos fenólicos durante 1 hora a 4 °C dentro do refrigerador. Usou-se papel de alumínio para cobrir os tubos de centrífuga.
- 4) Equilibraram-se os tubos de centrífuga, numa balança. Só a última casa decimal pode variar na balança.
- 5) Centrifugou-se a 15.000 g durante 15 minutos a 4°C.

- 6) Para amostras sólidas retiraram-se 0.5 mL de sobrenadante para cada tubo de ensaio identificado com o símbolo da amostra e perpez-se até 1 mL com água destilada.
- 7) Para amostras aquosas retiraram-se 0.150 mL de sobrenadante para cada tubo de ensaio identificado com o símbolo da amostra e perpez-se até 1 mL com água destilada.
- 8) Homogeneizaram-se todos os tubos de ensaio no vortex.
- 9) Adicionou-se Na_2CO_3 e Folin-Ciocalteu como na preparação dos tubos de ensaio para a curva de calibração.
- 10) Após 120 minutos, leu-se a absorvância a 760 nm.
- 11) Usou-se como branco a concentração de ácido tânico em $\mu\text{g/mL}$ igual a zero. E como controlos as restantes concentrações de ácido tânico em $\mu\text{g/mL}$ preparadas para a curva de calibração.
- 12) Baseado na curva de calibração linear do gráfico de concentração de ácido tânico versus absorvância, determinaram-se equivalentes de ácido tânico por mg de amostra seca, tendo em conta o factor de diluição das amostras usado nos passos 6 e 7 e a percentagem de humidade da amostra.

3.3.5 Determinação da actividade antioxidante – Método ABTS

Para saber se os polifenóis característicos da bolota estão presentes após a cozedura da bolota, avalia-se a actividade antioxidante pelo método do ABTS, em todas a fases do processamento.

A análise de capacidade de sequestrar os radicais livres ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) foi descrita por RE *et al.*, 1999. O radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi formado por uma reacção química com persulfato de potássio.

Preparação de soluções:

Preparou-se uma solução 7mM de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico):

- Colocaram-se 3.31 mg de persulfato de potássio num balão volumétrico de 5mL, preparou-se e aferiu-se com água destilada;
- Colocaram-se 19.2 mg de ABTS noutro balão volumétrico de 5 mL, preparou-se e aferiu-se com o persulfato de potássio preparado anteriormente.

Guardou-se protegida no escuro à temperatura ambiente durante 12 a 16 horas.

Misturou-se 1 mL da solução ABTS•+ com 80 mL de etanol.

Preparação dos tubos para a curva de calibração:

- 1) Pipetaram-se 0; 250; 500; 750; 1000 µl de solução padrão 400 µM de Trolox ($C_{14}H_{18}O_4$) para 5 tubos com tampa identificados e adicionaram-se 1000; 750; 500; 250; 0 µl de água destilada, respectivamente. Homogeneizou-se no vortex.
- 2) Identificaram-se em triplicado os 5 tubos com tampa com a referência de concentração de Trolox em µM: 0 (o branco); 100; 200; 300 e 400 (os controlos), respectivamente.
- 3) Em cada tubo adicionou-se 1 mL de solução ABTS•+ e 50 µl de amostra apropriadamente diluída. Homogeneizou-se no vortex.
- 4) Deixou-se reagir no escuro durante 15 minutos.
- 5) Leu-se a absorvância 734 nm.
- 6) Traçou-se o gráfico concentração de Trolox versus absorvância.
- 7) Traçou-se também a curva de calibração que de ser linear.

Preparação dos tubos para as amostras:

Identificaram-se em triplicado 6 tubos com a referência de símbolo da amostra: B; B1C; B2C100; B3C100, B1C50, B2C50, respectivamente. A amostra usada foi a mesma do método de determinação dos polifenóis totais.

- 1) Em cada tubo adicionou-se 1 mL de solução ABTS•+ e 50 µl de amostra apropriadamente diluída. Homogeneizou-se no vortex.
- 2) Deixou-se reagir no escuro durante 15 minutos.
- 3) Leu-se a absorvância 734 nm.

- 4) Usou-se como branco a concentração de Trolox em μM igual a zero. E como controlos as restantes concentrações de Trolox em μM preparadas para a curva de calibração.
- 5) Baseado na curva de calibração linear do gráfico concentração de Trolox versus absorvância, determinou-se equivalentes de μM Trolox de actividade antioxidante/mg de amostra seca, tendo em conta o factor de diluição das amostras usado no passo 6 do método de determinação dos polifenóis totais e a percentagem de humidade da amostra.

3.3.6 Método de determinação da digestibilidade proteica

Preparação de soluções:

Preparou-se a solução tampão de 0.1M de KH_2PO_4 a pH 2, colocaram-se 1.36 g num balão volumétrico de 100 mL, preparou-se e aferiu-se com água destilada, fez-se o acerto do pH com HCl.

Preparou-se a solução tampão de 0.1M de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a pH 7, colocaram-se 2.28 g num balão volumétrico de 100 mL, preparou-se e aferiu-se com água destilada, fez-se o acerto do pH com HCl.

Preparou-se a solução de NaOH 2M, 0.80 g num balão volumétrico de 10 mL, preparou-se e aferiu-se com água destilada.

Determinação da digestibilidade proteica *in vitro*

As amostras de bolota em pó foram sujeitas à digestão proteica *in vitro* usando pepsina (Pepsin from hog stomach – Sigma – P-7000 - 654 U/mg protein) como descreve Nunes (2004).

Colocaram-se em duplicado 100 mg de cada amostra de bolota em pó nos 12 tubos de centrífuga, previamente identificados B; B1C; B2C100; B3C100; B1C50; B2C50. Foram digeridas as amostras de bolota em pó com adição a cada tubo centrífuga de 1 mL de pepsina (20 mg pepsina/mL tampão de 0.1M de KH_2PO_4 a pH 2). Colocaram-se os tubos de centrífuga num banho de água a 37°C para o tempo 0 minutos (controlo) e para o tempo 120 minutos. Após este período de tempo, a digestão foi parada com adição de 100 μl de 2M NaOH e cada tubo foi depois colocado num banho de gelo.

Centrifugaram-se todas as amostras a 2000 rpm, 25°C durante 3 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e os resíduos lavaram-se com 1 mL de solução tampão 0.1M K₂HPO₄, centrifugou-se e lavou-se com 1 mL de água. Os resíduos foram congelados, liofilizados e pesados. A quantidade total de N presente nas amostras controlo e a 120 minutos de digestão da proteína foram determinadas por análise elementar de N. Determinou-se a percentagem da proteína na amostra controlo e a 120 minutos de digestão proteica pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Azoto} \times 6.25 \quad (3.2)$$

E o rendimento da digestibilidade proteica (DP) determinou-se segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Digestibilidade proteica \%} = \frac{\% \text{ Proteína (t0)} - \% \text{ Proteína (t120)}}{\% \text{ Proteína}} \times 100 \quad (3.3)$$

Onde,

- % de proteína (t0) corresponde à quantidade total de N presente nas amostras controlo
- % de proteína (t120) corresponde à quantidade N presente nas amostras a 120 minutos de digestão da proteína.

3.4 Produção do pão

Foram produzidos 4 tipos de pão: pão de trigo, de bolota unicamente e dois tipos de pão misto de trigo com 10% de bolota; um com bolota da 2ª cozedura a 100°C e BC2100 outro com bolota da 2ª cozedura a 50°C. BC250. A tabela 3.2 apresenta a formulação usada para os pães.

Tabela 3.2: Fórmula dos pães preparados.

Procedimento	Pão de trigo	Pão de bolota	Pão de bolota B2C100	Pão de bolota B2C50
Triturou-se as bolotas				
Colocou-se na amassadeira				
Farinha de TrigoTipo 65	120g	-----		100,4g
Farinha de bolota	-----	120g		9,6g
Sal de cozinha	1,2g	1,2g		1,2g
Água	60 mL	40 mL		60 mL
Amassou-se	3 minutos	3 minutos		3 minutos
Aos 6 minutos de amassar				
levedura seca	1,2g	1,2g		1,2g
Amassou-se	3 minutos	3 minutos		3 minutos
Tirou-se para uma vasilha	a massa	a massa		a massa
Colocaram-se	a massa numa vasilha	a massa numa vasilha		a massa numa vasilha
Levedou	1h 30 minutos a 25 °C	1h 30 minutos a 25 °C		1h 30 minutos a 25 °C
Aqueceu-se o forno	de forma gradual a 170°C	de forma gradual a 170°C		de forma gradual a 170°C
Cozeu-se o pão	45 minutos	45 minutos		45 minutos
Colocou-se a arrefecer	o pão cozido a 25°C	o pão cozido a 25°C		o pão cozido a 25°C

Fórmula do pão e as medições realizadas ao longo do processo:

Triturou-se a bolota de cada tipo até obter farinha no copo da trituradora.

Numa vasilha pesaram-se 120 g de farinha de trigo tipo 65 ou farinha de bolota e colocaram-se numa vasilha. Misturaram-se com 1% de sal (1,2 g). Adicionou-se o volume de água de forma contínua. Depois adicionou-se 1% de fermento desidratado (1,2 g). Amassa-se mais 3 minutos.

Colocaram-se as massas em diferentes formas de inox untada e polvilhada com farinha. Deixou-se levedar durante hora e meia a 25°C.

O forno foi pré-aquecido a 250°C. Colocaram-se as formas com pães no forno e baixou-se a temperatura do forno para os 170°C. O pão foi cozido durante 45 minutos. Desligou-se o forno e deixou-se arrefecer um pouco com o decréscimo gradual da temperatura no forno durante 10 minutos.

Determinou-se o volume de crescimento do pão. Retiraram-se os pães das formas e procedeu-se ao arrefecimento gradual dos pães, num ambiente quente. Pôde-se tapar com uma folha de alumínio para não haver contaminações de esporos no ar. Estas condições foram criadas numa padaria caseira.

De acordo com Ballester et al., 1995, os pães produzidos foram avaliados empiricamente relativamente a:

Forma, cor da crosta, textura ao corte, poro do miolo, aspecto do miolo e humidade do miolo como apresentado na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Características dos pães (Adaptado de Ballester *et al.*, 1995).

Volume e peso				
Forma	Muito volumoso	Volume normal		Achatado
Cor da Crosta	Clara	Normal	Pouco escura	Escura
Textura ao corte	Firme	Firme normal	Firme Esfarela	Esfarela
Poro do miolo	Fino	Fino-médio	Médio-grosso	Grosso
Miolo	Irregular	Regular	Regular com alvéolos	Com alvéolos
Miolo	Firme húmido	Médio	Médio húmido	Pegajento

3.5 Prova organoléptica

Foi utilizado um teste afectivo de aceitação com escala hedónica. Com este teste pretende-se inferir até que ponto o consumidor não rejeita o produto. As amostras foram apresentadas aos provadores em separado e estes pontuaram o carácter agradável da amostra numa escala hedónica de 9 pontos:

1. Extremamente desagradável.
2. Muito desagradável.
3. Desagradável.
4. Pouco desagradável.
5. Indiferente.
6. Pouco agradável.
7. Agradável.
8. Muito agradável.
9. Extremamente agradável.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cozedura da bolota

Foi usado o método de cozedura por ser o mais natural, usado na culinária para redução dos taninos em frutos (Butler, 1989).

A água utilizada foi sempre água destilada e no ponto de ebulição com o objectivo de retirar os taninos da bolota de forma rápida. A autora provou as bolotas ao longo da cozedura durante 1 hora e verificou que a cozedura ocasionou uma perda de adstringência da bolota. Como se seleccionou a bolota doce, de baixo teor de taninos, foi necessária uma ligeira cozedura da bolota, que torna o processo mais económico e rápido. A partir dos 20 minutos de cozedura a 100°C as bolotas ficavam sem o seu sabor original. E também se reparou que a água ficava cada mais acastanhada e viscosa. A água ficou viscosa, porque o amido sofre gelatinização (Eastwood, 2003).

Como resultado desta primeira experiência foram escolhidos intervalos de cozedura de 10 minutos. Neste trabalho também se analisaram outras possibilidades de obter bolota cozida com baixo teor em taninos, como a cozedura da bolota com pele a 50°C até um máximo de 20 minutos, em fases de 10 minutos. Há artigos a relatar a demolha por várias águas limpas até que a água recuperada não seja acastanhada (Ciesla, 2002).

Relativamente à água que sai da cozedura a 100°C foi observado que na segunda cozedura da bolota durante 10 minutos, se recuperou água avermelhada. O que pode significar que houve extracção dos taninos, porque é uma característica natural dos taninos tingir a água de vermelho. Na terceira cozedura durante 10 minutos, sai água acastanhada e viscosa e a bolota perde um pouco a sua consistência, devido à gelatinização do amido.

4.2 Percentagem de aproveitamento da bolota doce

A nível industrial é conveniente congelar a bolota para a poder utilizar ao longo do ano. Desta forma é necessário proceder à selecção das bolotas antes de seu congelamento.

Os resultados obtidos para determinação das massas extraídas da bolota foram os seguintes:

De 993,30g de bolota crua a massa de más e boas com casca foi de 326,6g e 666,7g, respectivamente. A massa de cascas das boas foi de 159,70g.

A massa de subprodutos foi de 486,30 g que inclui a massa das más e a massa de cascas das boas. Assim a percentagem de aproveitamento da bolota doce é de 48,96 %.

4.3 Massas das bolotas e os volumes de águas de cozedura

Na tabela 4.1 estão apresentadas as massas iniciais e finais das bolotas, volume de água inicial e volume de água recuperado, na cozedura das bolotas durante fases de cozedura de 10 minutos a 100°C e a 50°C, respectivamente.

Tabela 4.1: Massas iniciais e finais das bolotas, e volumes de água inicial e recuperado, na cozedura das bolotas a 100°C, durante fases de cozedura de 10 minutos.

Cozedura da bolota a 100 °C durante 10 minutos	Unidade	1ª	2ª	3ª
Massa de Bolota inicial	g	506,30	460,30	405,10
Volume inicial de água destilada	mL	500,00	400,00	400,00
Massa de Bolota final	g	540,60	483,30	403,00
Volume de água recuperado	mL	245,00	215,00	260,00
Referência das águas de cozedura		A1C100	A2C100	A3C100

A água de cozedura A1C100, A2C100 e A3C100, correspondem à água que foi recuperada na 1ª, 2ª, 3ª cozedura, respectivamente. A estas águas de cozedura foi feita análise de polifenóis, taninos e açúcares totais.

Na 3ª cozedura a 100°C a bolota deixa de absorver água e perde massa sob forma de puré, devido à gelatinização do amido (Correia *et al.*, 2010). Com uma solução de iodo testou-se a presença de amido, como se pode verificar na figura 4.1.



Figura 4.1: Presença de amido no puré de bolota.

As cozeduras sucessivas às bolotas sem pele a 100°C podem provocar variação da tonalidade da bolota e falta de consistência da bolota como mostra a figura 4.2. Também se pode verificar que a pele dá uma tonalidade dourada à bolota. Sem a pele a bolota ao fim das duas fases de cozedura de 10 minutos perde totalmente a sua cor original.

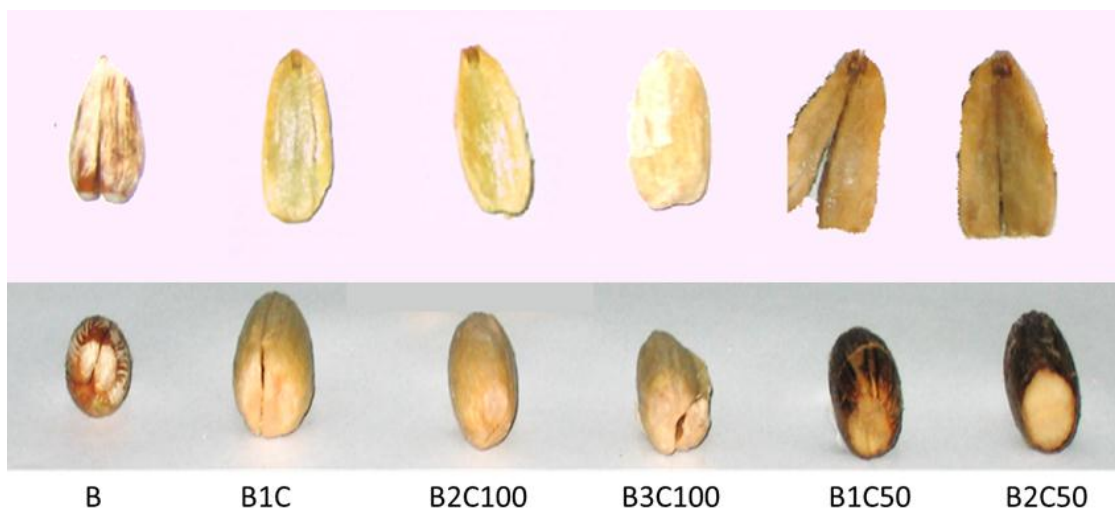


Figura 4.2: Variação da tonalidade e consistência da bolota doce cozida a 100°C.

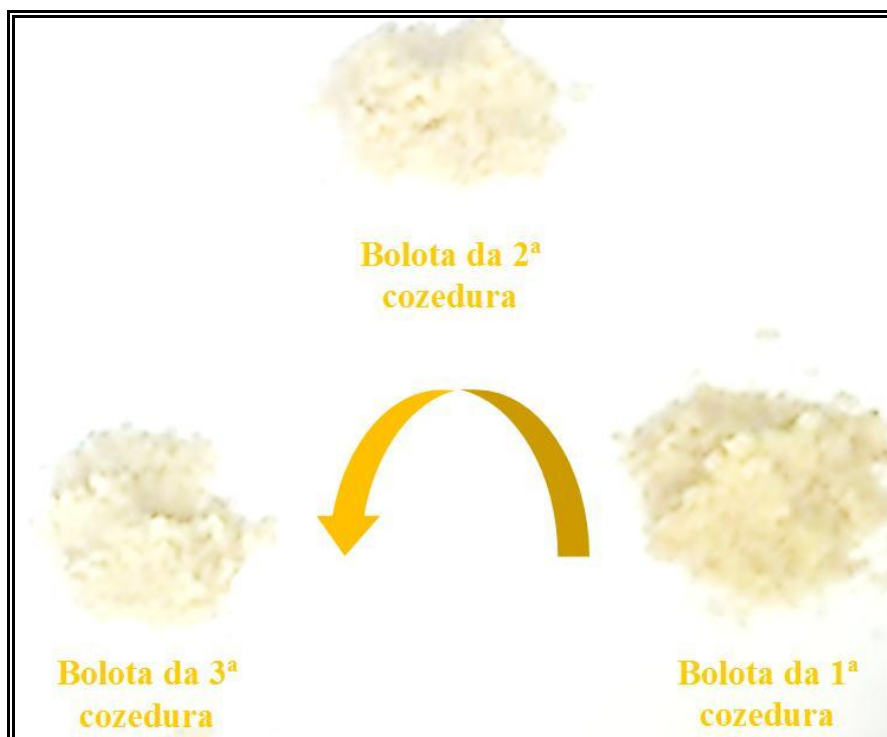


Figura 4.3: Variação da tonalidade da bolota doce cozida a 100°C.

Na tabela 4.2 são apresentadas as massas iniciais e finais das bolotas, e os volumes de água inicial e recuperado na cozedura das bolotas a 50°C durante fases de cozedura de 10 minutos.

Tabela 4.2: Massas iniciais e finais das bolotas, e volumes de água inicial e recuperado na cozedura das bolotas a 50°C durante fases de cozedura de 10 minutos.

Cozedura da bolota a 50 °C durante 10 minutos	Unidade	1ª	2ª
Massa de Bolota inicial	g	108,00	74,60
Volume inicial de água destilada	mL	300,00	300,00
Massa de Bolota final	g	116,60	76,50
Volume de água recuperado	mL	262,00	274,00

Na 2ª cozedura a 50°C entra menos água na bolota do que na 1ª cozedura a 50°C.

A bolota quando aquecida a 50°C absorve menos água do quando aquecida a 100°C.

4.4 Humidade

Na tabela 4.3 são apresentadas as percentagens de humidade das diferentes bolotas. As bolotas foram sempre cozidas durante 10 minutos, por cada cozedura.

Tabela 4.3: Percentagens de humidade das diferentes bolotas (%).

		% Humidade
B	Bolota crua raspada (sem pele)	23
B1C	Bolota da 1ª cozedura a 100°C (com pele)	39
B2C100	Bolota da 2ª cozedura a 100°C (sem pele)	47
B3C100	Bolota da 3ª cozedura a 100°C (sem pele)	49
B1C50	Bolota da 1ª cozedura a 50°C (com pele)	38
B2C50	Bolota da 2ª cozedura a 50°C (com pele)	48
Pele	Pele fina raspada crua	23
Be	Bolota externa crua junto à pele	21
Bi	Bolota parte interna	22

A figura 4.4 apresenta as percentagens de humidade da bolota crua e das bolotas cozidas a 100°C.

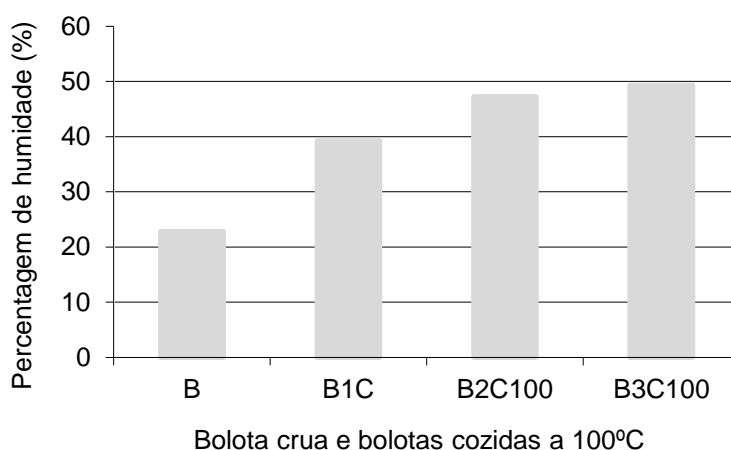


Figura 4.4: Percentagens de humidade da bolota crua e das bolotas cozidas a 100°C.

A bolota absorve 16% de água durante a primeira cozedura a 100°C. Nas cozeduras seguintes, continua a ocorrer absorção de água pela bolota mas em

quantidade gradualmente menor, verificando-se que na última cozedura a bolota absorve apenas 2% de água.

No caso da cozedura a 50°C, e de forma semelhante à cozedura a 100 °C a bolota absorve a maior quantidade de água na primeira e segunda cozeduras como mostra a figura 4.5. Os valores de humidade são concordantes às duas temperaturas de aquecimento.

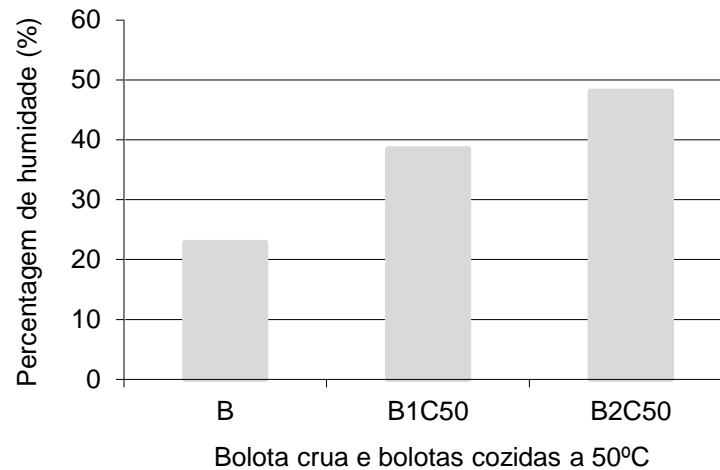


Figura 4.5: Percentagens de humidade da bolota crua e das bolotas cozidas a 50°C.

A humidade da pele da bolota é de (23 %). A fracção externa da bolota sem casca tem ligeiramente menor humidade com 21 %. E a fracção interna da bolota tem uma humidade intermédia de 22 %.

4.5 Açúcares totais extractáveis

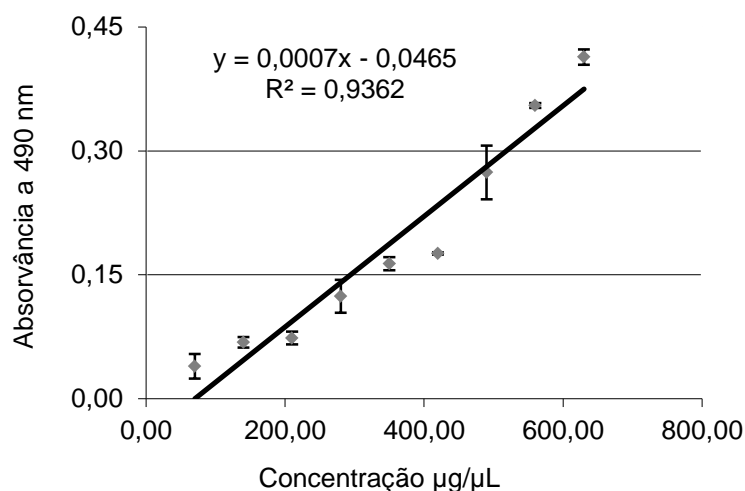


Figura 4.6: Curva de calibração de absorvância em função da concentração de açúcares em µg/µL.

Na tabela 4.4 são apresentadas as concentrações de açúcares totais extraídos presentes nas diferentes bolotas e águas de cozedura, expressas em equivalentes de açúcares por mg de amostra seca.

Tabela 4.4: Concentrações de açúcares, em µg/mg de amostra seca, presentes nas diferentes bolotas e nas águas de cozedura.

Nomenclatura	Amostra	Açúcares [] µg/mg
B	Bolota crua raspada (sem pele)	141,8
B1C	Bolota da 1ª cozedura a 100°C (com pele)	81,1
B2C100	Bolota da 2ª cozedura a 100°C (sem pele)	52,5
B3C100	Bolota da 3ª cozedura a 100°C (sem pele)	41,5
A1C100	Água da 1ª cozedura antes de tirar a pele a 100°C	9,0
A2C100	Água da 2ª cozedura da bolota sem pele a 100°C	6,1
A3C100	Água da 3ª cozedura da bolota sem pele a 100°C	4,3
B1C50	Bolota da 1ª cozedura a 50°C (com pele)	72,0
B2C50	Bolota da 2ª cozedura a 50°C (com pele)	42,8
A1C50	Água da 1ª cozedura da bolota com pele a 50°C	4,4
A2C50	Água da 2ª cozedura da bolota com pele a 50°C	7,4

Na figura 4.7 são expressas as concentrações de açúcares, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca, presentes na bolota crua e nas bolotas cozidas a 100°C .

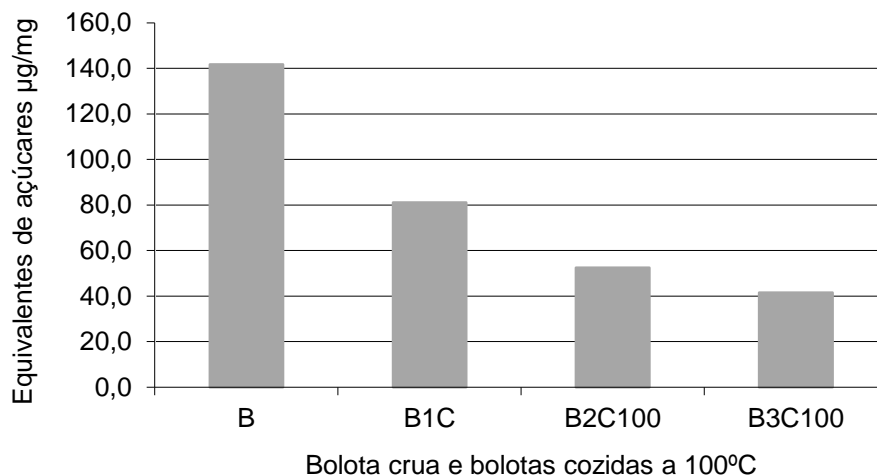


Figura 4.7: Equivalentes de açúcares, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca, presentes na bolota crua e bolotas cozidas a 100°C .

Verificou-se que a concentração de açúcares decresce muito na 1ª cozedura a 100°C . A concentração de açúcares decresce com menor intensidade nas posteriores cozeduras a 100°C .

Na figura 4.8 pode verificar-se que os equivalentes de açúcares em $\mu\text{g}/\text{mg}$ nas águas de cozedura das bolotas a 100°C são muito inferiores. Os cálculos foram feitos com base no volume de água recuperado e de amostra seca presente nas águas de cozedura das bolotas.

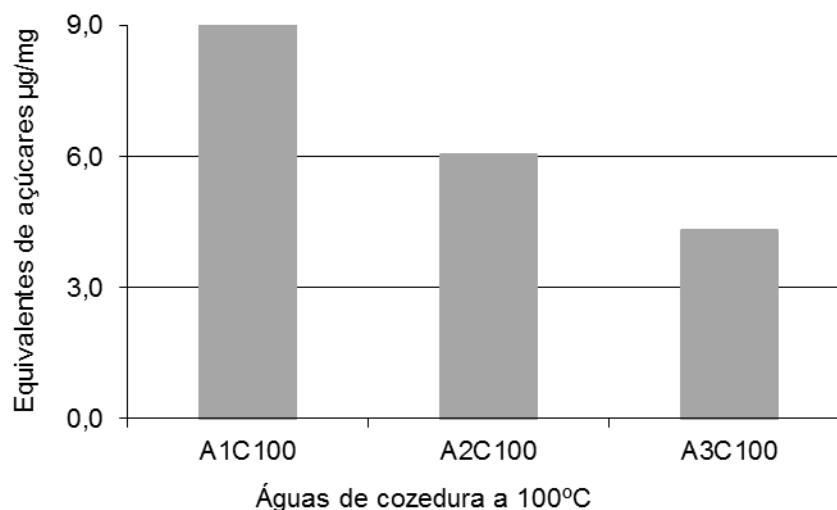


Figura 4.8: Equivalentes de açúcares, em µg/mg amostra seca, presentes nas águas de cozedura a 100°C.

Na figura 4.9 são expressas as concentrações de açúcares, em µg/mg de amostra seca, presentes nas bolotas cozidas a 50°C.

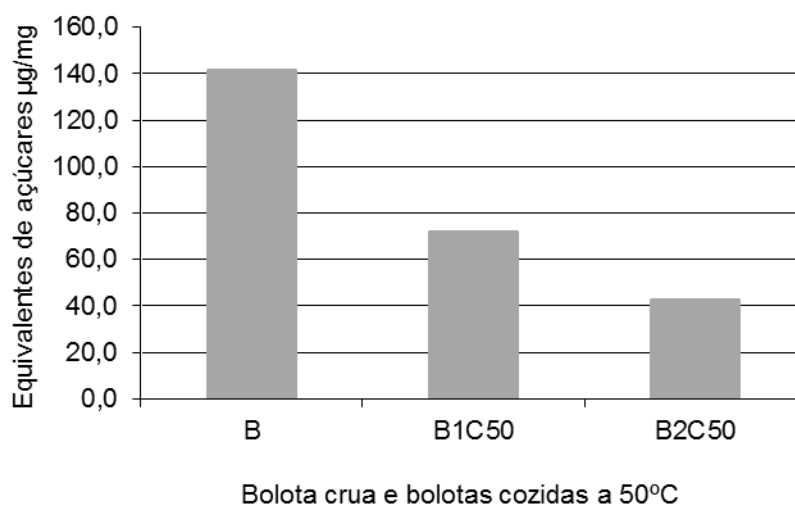


Figura 4.9: Equivalentes de açúcares, expressos em µg/mg de amostra seca, presentes na bolota crua e bolotas cozidas a 50°C.

Verificou-se que a concentração de açúcares decresce acentuadamente na primeira cozedura a 50°C e decresce com menor intensidade na segunda cozedura. Verificou-se que mesmo na presença da pele e a temperatura mais

baixa os açúcares se removem facilmente. Este facto revela ser uma vantagem na obtenção de alimento com baixo teor em açúcares.

As concentrações de açúcares em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca nas águas de cozedura a 50°C são muito inferiores como mostra a figura 4.10. Os cálculos foram feitos com base no volume de água recuperado e de amostra seca presente nas águas de cozedura das bolotas.

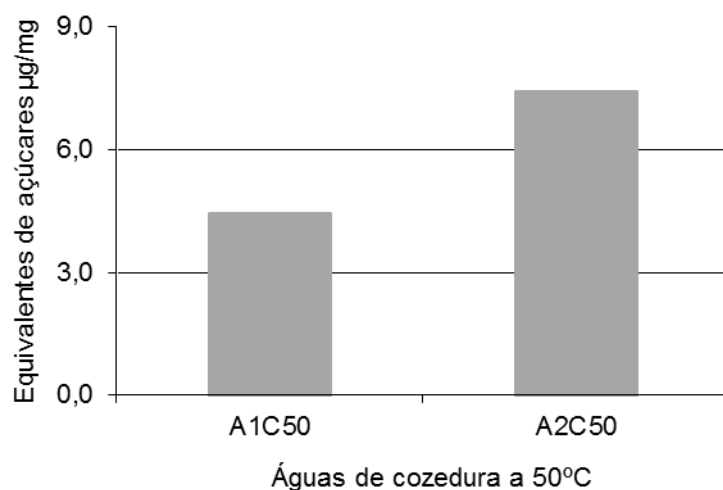


Figura 4.10: Equivalentes de açúcares, expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca, presentes nas águas de cozedura a 50°C .

4.6 Taninos

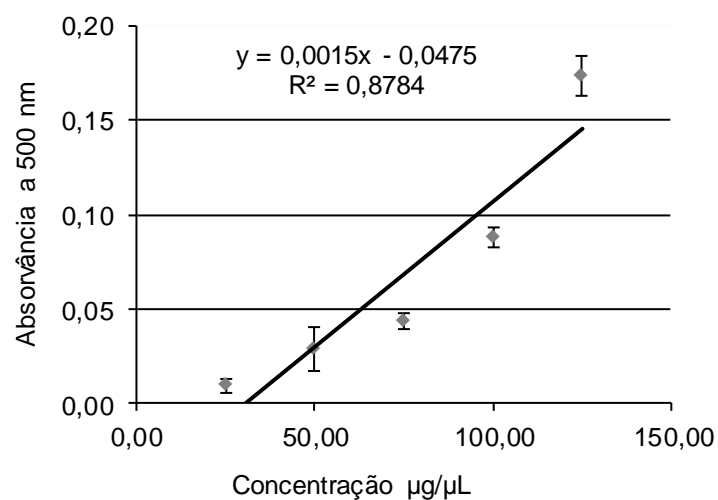


Figura 4.11: Curva de calibração de absorvância em função da concentração de ácido tânico em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para as amostras de bolota (B; B1C; B2C100; B3C100 e B1C50; B2C50), para determinação dos taninos.

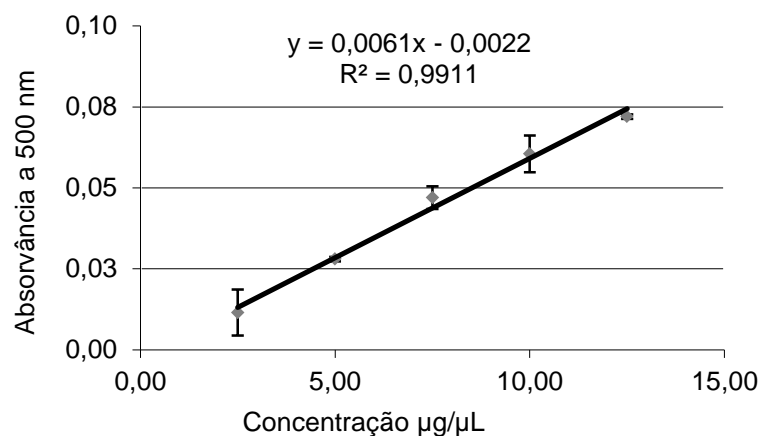


Figura 4.12: Curva de calibração de absorvância em função da concentração de ácido tânico em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para as amostras aquosas (A1C100; A2C100; A3C100; A1C50; A2C50; Pele; Be e Bi), para determinação dos taninos.

Na tabela 4.5 são apresentadas, as concentrações de taninos presentes nas diferentes bolotas e águas de cozedura, expressas em equivalentes de ácido tânico por mg de amostra seca.

Tabela 4.5: Concentrações de taninos expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca, presente nas diferentes bolotas e águas de cozedura.

		Equivalentes de ácido tânico µg/mg
B	Bolota crua raspada (sem pele)	0.2364
B1C	Bolota da 1ª cozedura a 100°C (com pele)	0.1290
B2C100	Bolota da 2ª cozedura a 100°C (sem pele)	0.1045
B3C100	Bolota da 3ª cozedura a 100°C (sem pele)	0.0954
A1C100	Água da 1ª cozedura antes de tirar a pele a 100°C	0.6830
A2C100	Água da 2ª cozedura da bolota sem pele a 100°C	0.0710
A3C100	Água da 3ª cozedura da bolota sem pele a 100°C	0.0500
B1C50	Bolota da 1ª cozedura a 50°C (com pele)	0.1325
B2C50	Bolota da 2ª cozedura a 50°C (com pele)	0.1075
A1C50	Água da 1ª cozedura da bolota com pele a 50°C	0.3850
A2C50	Água da 2ª cozedura da bolota com pele a 50°C	0.2500
Pele	Pele	0.4835
Be	Parte externa da bolota	0.3965
Bi	Parte interna da bolota	0.2042

4.6.1 Nas bolotas cozidas a 100°C

Pode verificar-se na figura 4.13, que os taninos são extraídos da bolota por cozedura.

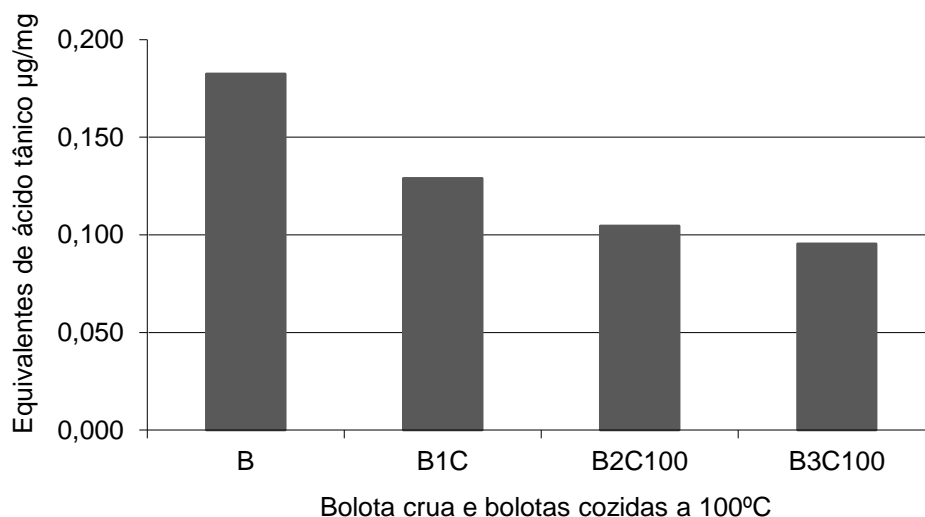


Figura 4.13: Concentrações de taninos, expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca, presentes na bolota crua e bolotas cozidas a 100°C.

Os taninos que estão presentes na pele da bolota, são extraídos para a água na 1ª cozedura a 100°C, como mostra a figura 4.14.

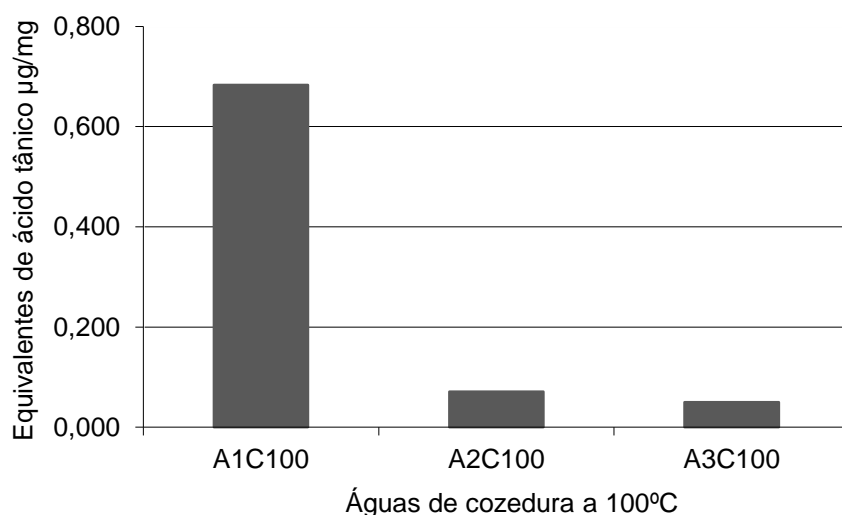


Figura 4.14: Concentrações de taninos, expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca, presentes na água de cozedura das bolotas a 100°C.

4.6.2 Nas bolotas cozidas a 50°C

Pode verificar-se na figura 4.15 que os taninos são extraídos da bolota desde a 1ª cozedura a 50°C.

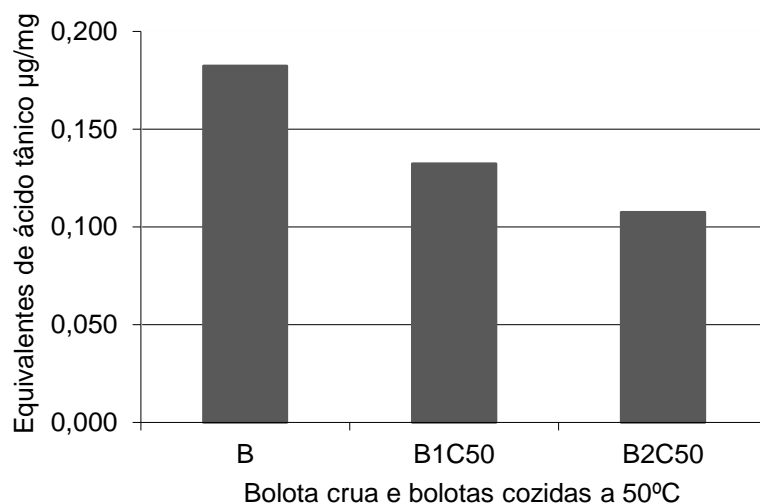


Figura 4.15: Concentrações de taninos expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca, presentes nas bolotas cozidas a 50°C e bolota crua.

Pode verificar-se que mesmo a baixas temperaturas de 50°C e na presença de pele, os taninos decrescem muito. Este facto vem comprovar que

se pode baixar a temperatura a 50°C e bastam duas demolhas para extrair uma quantidade considerável e necessária de taninos da pele e do endosperma da bolota.

Relativamente aos taninos há correspondência, entre a bolota da 1ª cozedura a 100°C e a bolota da 1ª cozedura a 50°C e entre a bolota da 2ª cozedura a 100°C e a bolota da 2ª cozedura a 50°C.

Os taninos que estão presentes na pele da bolota, saem gradualmente para as águas de cozedura a 50°C, como mostra a figura 4.16.

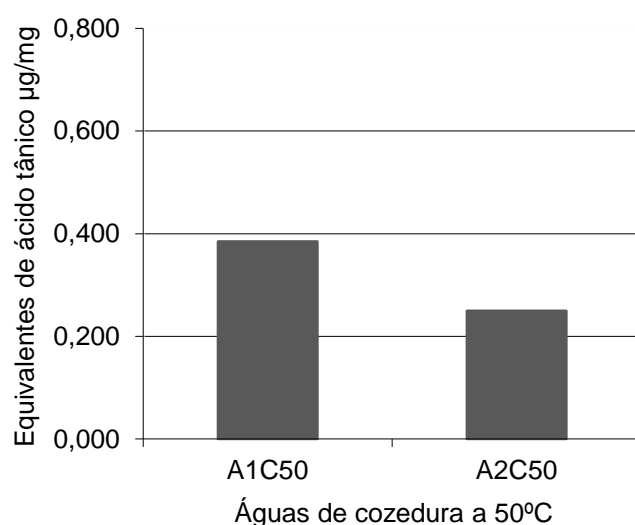


Figura 4.16: Concentrações de taninos, expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca, nas águas de cozedura a 50°C.

As concentrações de taninos em percentagem (%) nas fracções da bolota são apresentadas na figura 4.17.

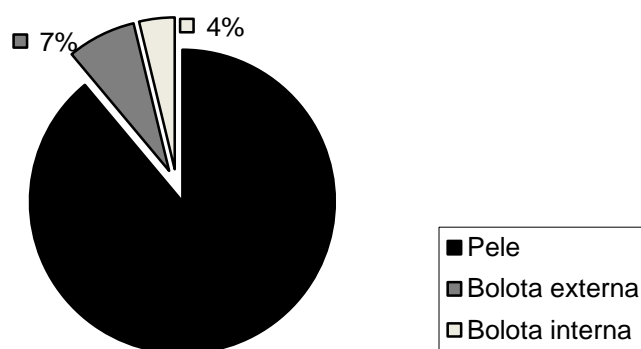


Figura 4.17: Concentração de taninos em percentagem (%) nas fracções da bolota.

A maior concentração de taninos está presente na pele da bolota e é cerca de 89%. A parte da bolota externa crua junto à pele tem uma maior concentração de taninos do que a parte da bolota interna.

4.7 Polifenóis e actividade antioxidante

As curvas de calibração para determinação dos polifenóis e para determinação da acção antioxidante dos componentes da bolota são apresentadas nos seguintes gráficos.

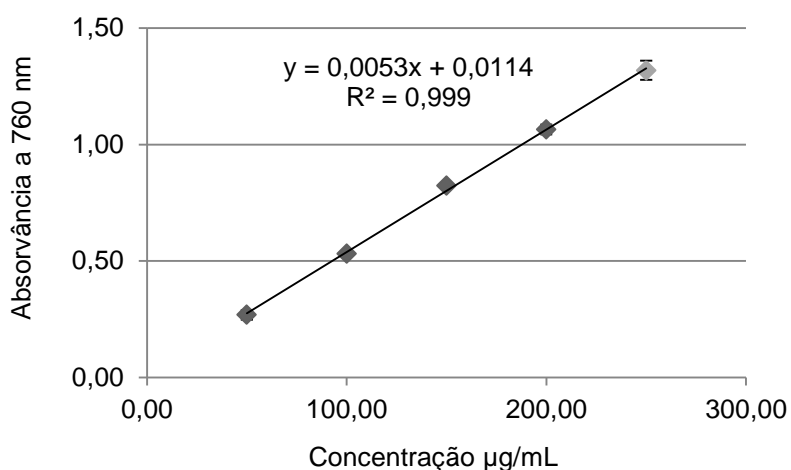


Figura 4.18: Curva de calibração de absorvância em função da concentração de ácido tânico em µg/mL, para determinação dos polifenóis.

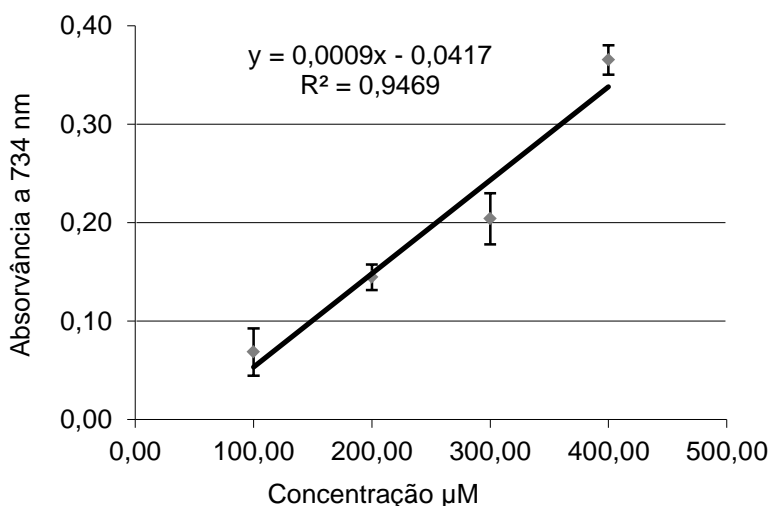


Figura 4.19: Curva de calibração da absorvância em função da concentração de Trolox em µM, para determinação da acção antioxidante dos componentes da bolota.

4.7.1 Nas bolotas cozidas a 100°C

Na tabela 4.6 são apresentadas as concentrações de polifenóis e as respectivas capacidades antioxidantes, das diferentes bolotas cozidas a 100°C, em equivalentes de ácido tânico por mg de amostra seca da bolota e em equivalentes de µM Trolox por mg amostra seca da bolota, respectivamente.

Tabela 4.6: Concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg e capacidade antioxidante em equivalentes µM Trolox/mg de amostra seca, para a bolota crua e as bolotas cozidas a 100°C.

	Polifenóis	Capacidade Antioxidante
	□ µg/mg	□ µM/mg
B	10,3	8,2
B1C	8,8	9,8
B2C100	6,2	15,2
B3C100	4,5	11,1

As concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca para a bolota crua e as bolotas cozidas a 100°C são apresentadas na figura 4.20.

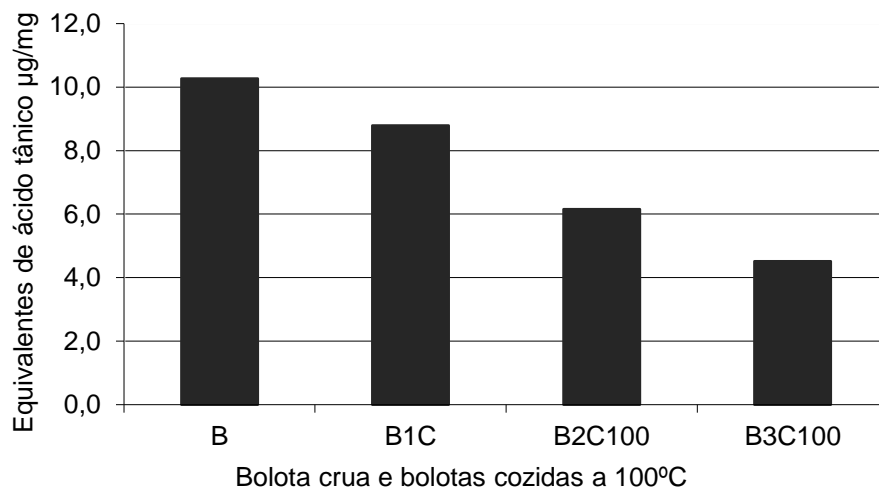


Figura 4.20: Concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca para a bolota crua e as bolotas cozidas a 100°C.

A concentração de polifenóis decresce gradualmente com a cozedura a 100°C.

De modo a determinar qual o tempo mais favorável para a cozedura da bolota em termos de actividade antioxidante foi feita a sua determinação nas diferentes bolotas e obtiveram-se os resultados apresentados na figura 4.21.

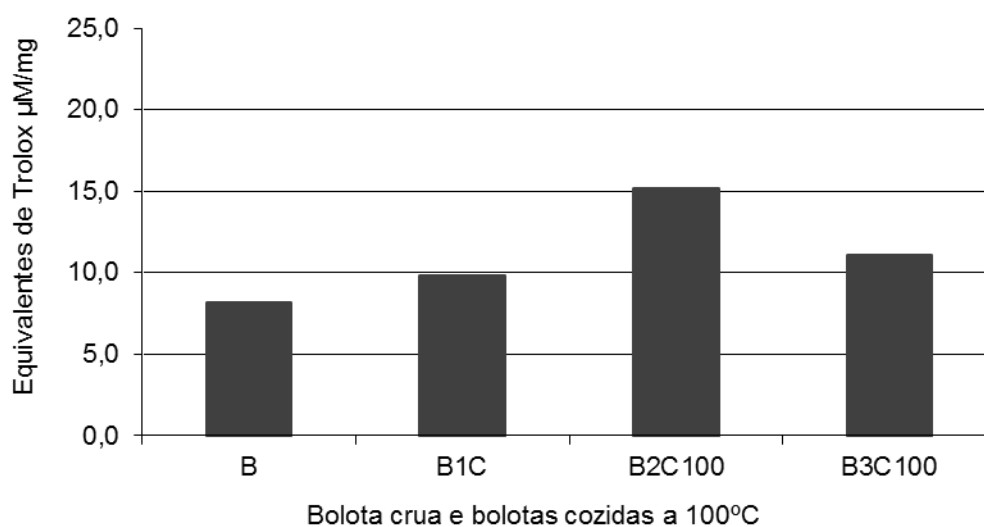


Figura 4.21: Equivalentes em µM Trolox de actividade antioxidante/mg de amostra seca para a bolota crua e as bolotas cozidas a 100°C.

Para as bolotas cozidas a 100°C pode verificar-se que não há relação directa entre a concentração de polifenóis na bolota e a sua actividade antioxidante. À medida que a concentração de polifenóis decresce com a cozedura, a actividade antioxidante mostra diferentes resultados para as diferentes bolotas ao longo das cozeduras. A capacidade de sequestrar radicais ABTS⁺ mostra ser baixa para a bolota crua sem pele e aumenta um pouco na 1ª cozedura de 10 minutos. À 2ª cozedura de 10 minutos mostra um aumento considerável de capacidade antioxidante, mas esta volta a decrescer à 3ª cozedura de 10 minutos.

A bolota (B2C100) apresenta valor antioxidante mais alto. Tendo em conta que a concentração de polifenóis e taninos diminuiu, é relevante que o poder antioxidante aumente. Podemos especular que a cozedura extrai compostos que inibem o poder antioxidante e que a sua saída o incrementa.

4.7.2 Nas bolotas cozidas a 50°C

Na tabela 4.7 são apresentadas as concentrações de polifenóis e as respectivas capacidades antioxidantes, das diferentes bolotas cozidas a 50°C, em equivalentes de ácido tânico por mg amostra seca da bolota e em equivalentes de μM Trolox por mg amostra seca da bolota, respectivamente.

Tabela 4.7: Concentrações de polifenóis, expressas em equivalentes de ácido tânico em $\mu\text{g}/\text{mg}$ e capacidade antioxidante em equivalentes μM Trolox/mg de amostra seca, para as bolotas cozidas a 50°C.

	Polifenóis	Actividade antioxidante
	$\mu\text{g}/\text{mg}$	$\mu\text{M}/\text{mg}$
B1C50	6,9	9,4
B2C50	5,7	21,0

As concentrações de polifenóis, expressas em equivalentes de ácido tânico em $\mu\text{g}/\text{mg}$ da amostra seca, para as bolotas cozidas a 50°C, são apresentadas na figura 4.22.

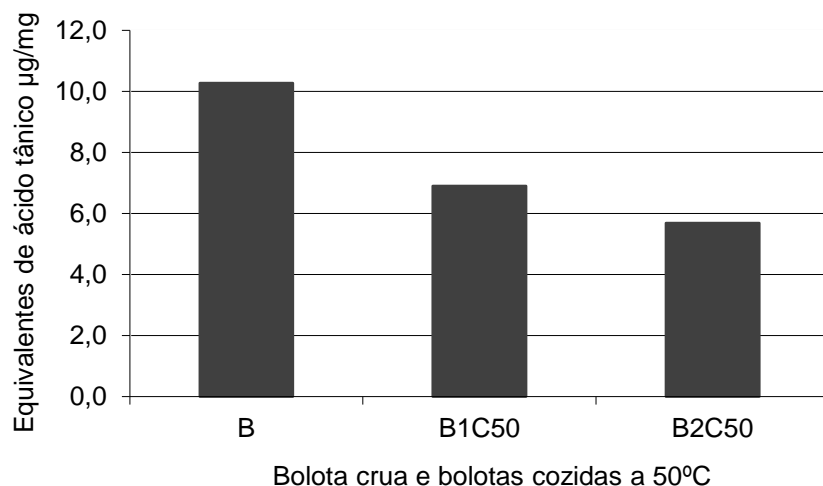


Figura 4.22: Concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca, para as bolotas cozidas a 50°C e bolota crua.

Para a bolota cozida com a pele a 50°C pode verificar-se que a concentração de polifenóis decresce, ao longo dos períodos de 10 minutos de cozedura. Assim, estudou-se a actividade antioxidante para estas diferentes bolotas e obtiveram-se os resultados apresentados na figura 4.23.

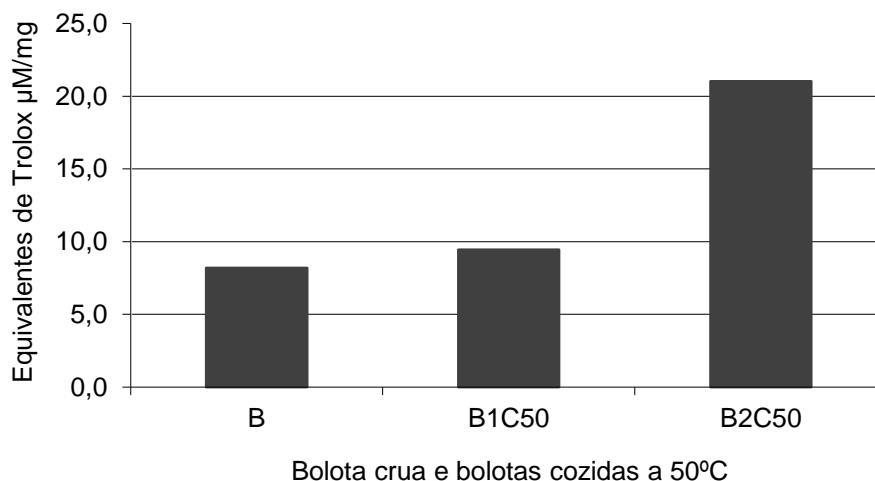


Figura 4.23: Equivalentes em µM Trolox de actividade antioxidante/mg de amostra seca, para a bolota crua e bolotas cozidas a 50°C.

Segundo Cantos *et al.* (2003) os extractos de endosperma da bolota mostram ter menor capacidade de peroxidação lipídica que os extractos da

pele. Os resultados obtidos estão de acordo com esta afirmação. Neste caso as bolotas foram cozidas com pele e há um aumento considerável de actividade antioxidante, para a bolota cozida até aos 20 minutos, com mudança de água destilada aos 10 minutos de cozedura.

A pele da bolota doce é uma barreira, que permite conservação da bolota como alimento humano e tem a função de prevenir a peroxidação lipídica dos ácidos gordos (principalmente do ácido linolénico presente na bolota, aproximadamente 20% quantificado por Cantos *et al.*, 2003).

A actividade antioxidante pode estar relacionada, com a presença de componentes antioxidantes no endosperma da bolota tais como, galotaninos ligados ao quercitol, descritos por Cantos *et al.*, 2003.

É de salientar que estes resultados do aumento do valor antioxidante com a cozedura corroboram os obtidos para a bolota cozida a 100°C. Os teores tanto de taninos como de polifenóis nas duas amostras em causa B2C100 e B2C50 é similar, ao que o valor antioxidante seja algo mais alto no caso da segunda bolota.

4.7.3 Polifenóis presentes nas águas de cozedura

As concentrações de polifenóis, expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca presente nas águas de cozedura das bolotas são apresentadas na tabela 4.8. Os cálculos estão feitos com base no volume de água recuperado e de amostra seca presente nas águas de cozedura das bolotas.

Tabela 4.8: Concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca presente nas águas de cozedura das bolotas.

	Polifenóis [] µg/mg
A1C100	1,1
A2C100	0,6
A3C100	0,5
A1C50	1,4
A2C50	1,3

As concentrações de polifenóis, expressas em equivalentes de ácido tânico em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca presente nas águas de cozedura das bolotas a 100°C , são apresentadas na figura 4.24.

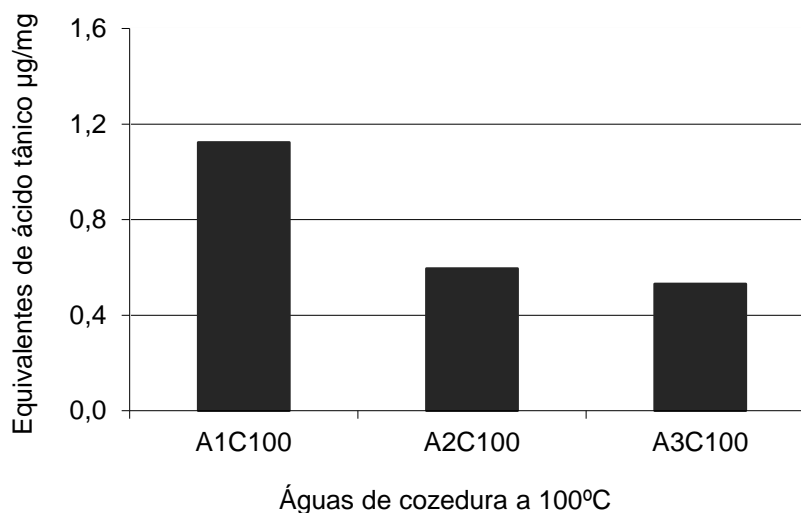


Figura 4.24: Concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca presente nas águas de cozedura das bolotas a 100°C .

A primeira cozedura da bolota retira uma grande quantidade de polifenóis, a segunda e a terceira continuaram a retirar polifenóis, mas em menor quantidade.

As concentrações de polifenóis, expressas em equivalentes de ácido tânico em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra seca presente nas águas de cozedura das bolotas a 50°C , decrescem como mostra a figura 4.25.

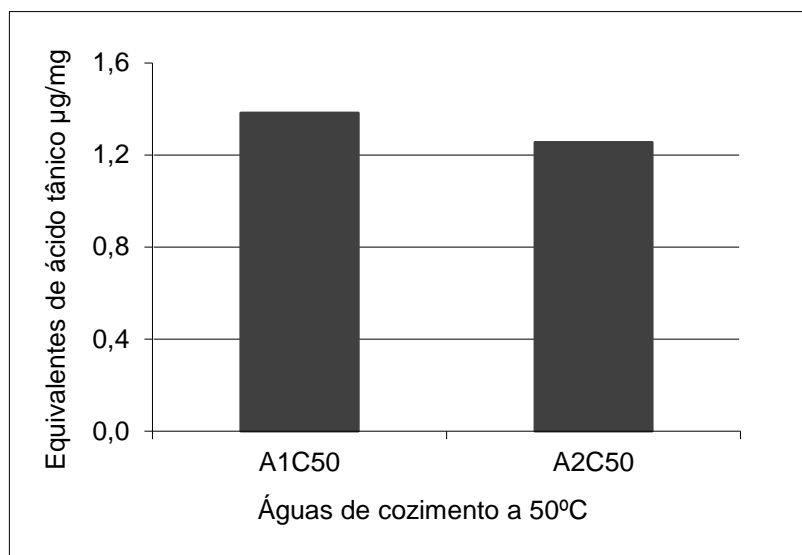


Figura 4.25: Concentrações de polifenóis expressas em equivalentes de ácido tânico em µg/mg de amostra seca presente nas águas de cozedura a 50°C.

Em conclusão, a cozedura parece ser benéfica não só pelo facto de retirar taninos mas também favorece o poder antioxidante da bolota. Serão precisos mais estudos para determinar quais os tipos de compostos que são extraídos ou que são modificados e que estão na base do aumento da capacidade antioxidante com a cozedura.

4.8 Digestibilidade proteica

Os taninos, especialmente taninos condensados, ao combinarem-se com as proteínas existentes na bolota durante o processamento (cozedura) formam um complexo tanino – proteína. Este complexo não é digerido por acção de enzimas tais como a pepsina (Butler, 1984; Castro, 2009).

Na tabela 4.9 são apresentadas as percentagens de digestibilidade proteica, das diferentes fases de processamento das bolotas.

Tabela 4.9: Percentagens da digestibilidade proteica nas diferentes bolotas.

		Digestibilidade Proteica (%)
B	Bolota crua raspada (sem pele)	4,90
B1C	Bolota da 1ª cozedura a 100°C (com pele)	5,80
B2C100	Bolota da 2ª cozedura a 100°C (sem pele)	18,00
B3C100	Bolota da 3ª cozedura a 100°C (sem pele)	11,50
B1C50	Bolota da 1ª cozedura a 50°C (com pele)	5,80
B2C50	Bolota da 2ª cozedura a 50°C (com pele)	13,90

A digestibilidade proteica expressa em percentagem (%), na bolota crua e bolotas cozidas a 100°C, é apresentada na figura 4.26.

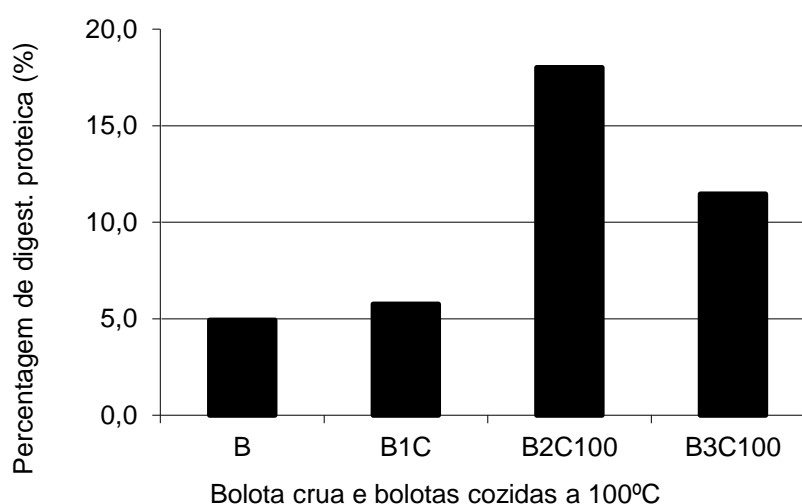


Figura 4.26: Digestibilidade proteica expressa em percentagem (%), na bolota crua e nas bolotas cozidas a 100°C.

A cozedura da bolota a 100°C aumenta a digestibilidade até à 2ª cozedura de 10 minutos, previsivelmente por remoção de taninos. Com uma outra cozedura posterior de 10 minutos perde-se parte da digestibilidade proteica. Este facto vem comprovar que a bolota ao ser cozida mais do que 20 minutos a 100°C com ou sem pele, reduz a digestibilidade proteica.

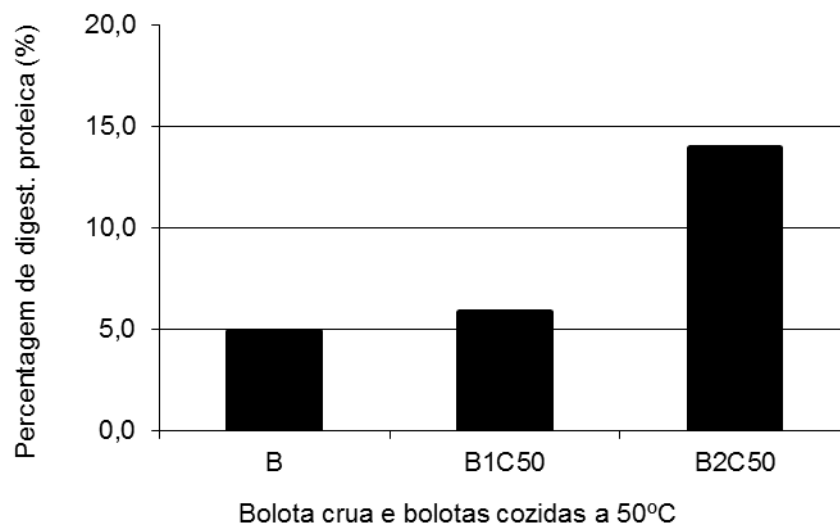


Figura 4.27: Digestibilidade proteica expressa em percentagem (%), na bolota crua e nas bolotas cozidas a 50°C.

A digestibilidade proteica expressa em percentagem (%), na bolota crua e nas bolotas cozidas a 50°C, está representada na figura 4.27.

Verifica-se que a cozedura da bolota a 50°C aumenta a digestibilidade até à 2ª cozedura de 10 minutos, por remoção de taninos, tal como a cozedura da bolota a 100°C. A bolota com pele da 1ª cozedura a 50°C comporta-se de modo semelhante à bolota com pele da 1ª cozedura a 100°C no mesmo tempo de cozedura de 10 minutos. E a bolota com pele da 2ª cozedura a 50°C comporta-se de modo semelhante à bolota sem pele da 2ª cozedura a 100°C, no mesmo tempo de cozedura.

De acordo com Castro (2009) a baixa digestibilidade proteica da bolota deve-se, em parte, à presença dos taninos que a bloqueiam através da formação de complexos insolúveis.

A cozedura da bolota foi importante porque baixou o teor em taninos e aumentou a digestibilidade proteica.

4.9 Caracterização do produto panificado

Os inquéritos foram feitos a um grupo de 16 pessoas.

As bolotas que apresentaram melhores características em função da actividade antioxidante foram utilizadas para elaborar pão, o qual foi caracterizado e submetido a uma prova de aceitação.

A figura 4.28 mostra os pães elaborados



Figura 4.28: Pão de trigo, pão de mistura com bolota B2C100, pão de mistura com bolota B2C50 e pão de bolota B2C100.

Nas tabelas seguintes estão apresentados os resultados da apreciação dos atributos gerais dos 4 pães produzidos.

Tabela 4.10: Número de pessoas que assinalaram com uma cruz os atributos que acharam corresponder ao produto (pão de trigo).

Volume e peso			223 cm ³ /100 g	
Forma	Muito volumoso	Volume normal		Achatado
	6	10	0	0
Cor da Crosta	Clara	Normal	Pouco escura	Escura
	5	9	2	0
Textura ao corte	Firme	Firme normal	Firme Esfarela	Esfarela
	5	9	1	0
Poros do miolo	Fino	Fino-médio	Médio-grosso	Grosso
	4	9	3	0
Miolo	Irregular	Regular	Regular com alvéolos	Com alvéolos
		9	7	0
Miolo	Firme húmido	Médio	Médio húmido	Pegajoso
	6	6	4	0

Tabela 4.11: Número de pessoas que assinalaram com uma cruz os atributos que acharam corresponder ao produto (pão de bolota B2C100).

Volume e peso			208 cm ³ /100 g	
Forma	Muito volumoso	Volume normal		Achatado
	1	5	0	10
Cor da Crosta	Clara	Normal	Pouco escura	Escura
			4	12
Textura ao corte	Firme	Firme normal	Firme Esfarela	Esfarela
				16
Poro do miolo	Fino	Fino-médio	Médio-grosso	Grosso
	13		1	2
Miolo	Irregular	Regular	Regular com alvéolos	Com alvéolos
	1	14	1	0
Miolo	Firme húmido	Médio	Médio húmido	Pegajoso
	2	3	9	0

Tabela 4.12: Número de pessoas que assinalaram com uma cruz os atributos que acharam corresponder ao produto (pão de trigo com bolota B2C100 (9:1)).

Volume e peso			177 cm ³ /100 g	
Forma	Muito volumoso	Volume normal		Achatado
	1	15		0
Cor da Crosta	Clara	Normal	Pouco escura	Escura
	3	10	2	0
Textura ao corte	Firme	Firme normal	Firme Esfarela	Esfarela
	4	7	3	0
Poro do miolo	Fino	Fino-médio	Médio-grosso	Grosso
	2	11	2	0
Miolo	Irregular	Regular	Regular com alvéolos	Com alvéolos
	1	6	7	0
Miolo	Firme húmido	Médio	Médio húmido	Pegajoso
	4	4	5	1

Tabela 4.13: Número de pessoas que assinalaram com uma cruz os atributos que acharam corresponder ao produto (pão de trigo com bolota B2C50 (9:1).

Volume e peso			177 cm ³ /100 g	
Forma	Muito volumoso	Volume normal		Achatado
	1	11		4
Cor da Crosta	Clara	Normal	Pouco escura	Escura
	3	5	7	1
Textura ao corte	Firme	Firme normal	Firme Esfarela	Esfarela
	5	9	1	1
Poro do miolo	Fino	Fino-médio	Médio-grosso	Grosso
	5	6	5	
Miolo	Irregular	Regular	Regular com alvéolos	Com alvéolos
	3	4	7	2
Miolo	Firme húmido	Médio	Médio húmido	Pegajoso
	8	1	6	1

O pão de trigo como pão de referência, de acordo com a diversidade das respostas, apresentou ser de muito volumoso a volume normal, com a cor da crosta clara a normal e textura ao corte firme húmido. O poro do miolo fino-médio e regular com alvéolos. A humidade do miolo apresentou ser firme-húmido a médio-húmido.

A seguir são apresentados os gráficos que permitem comparar os atributos dos pães de mistura com bolota (B2C100 e B2C50) e pão de bolota B2C100 com os atributos do pão de trigo.

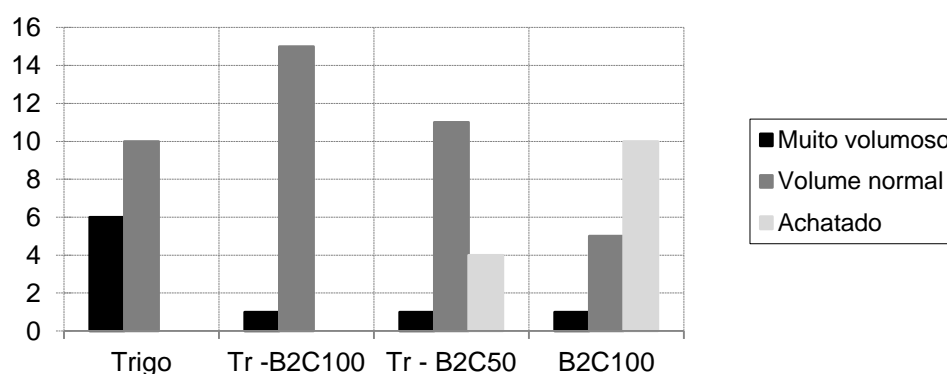


Figura 4.29: Atributos para a forma dos pães.

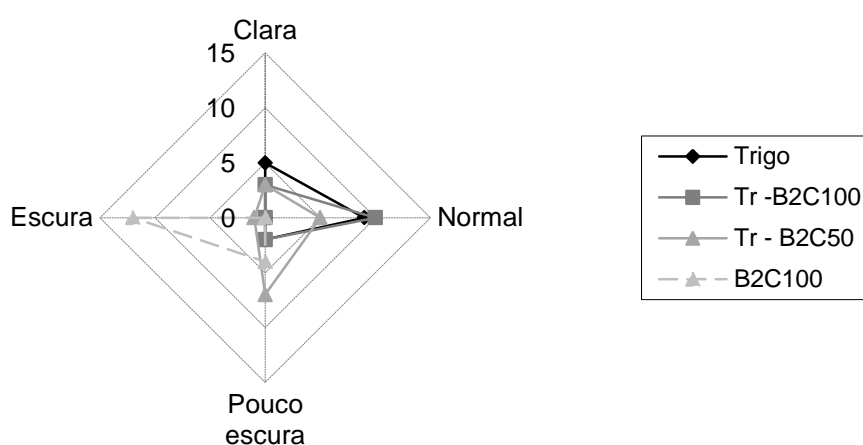


Figura 4.30: Atributos para a cor da crosta.

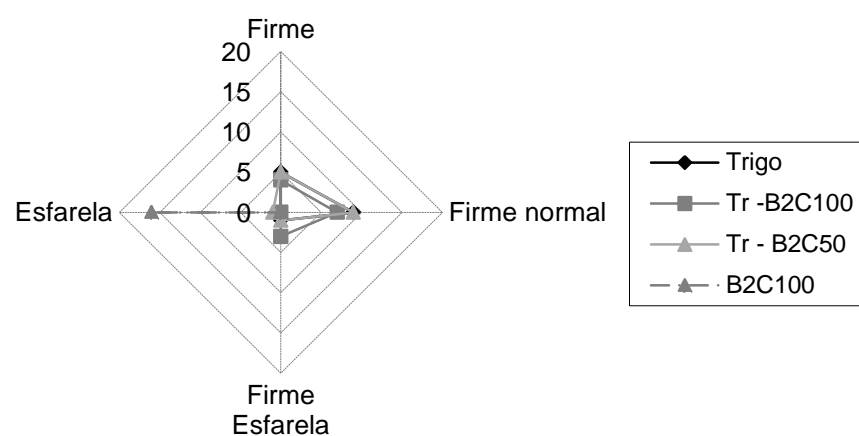


Figura 4.31: Atributos para a textura ao corte.

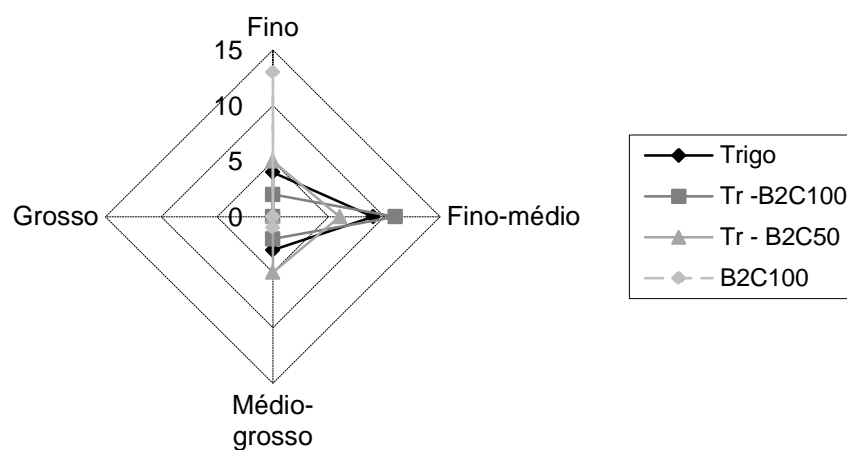


Figura 4.32: Atributos para o poro do miolo.

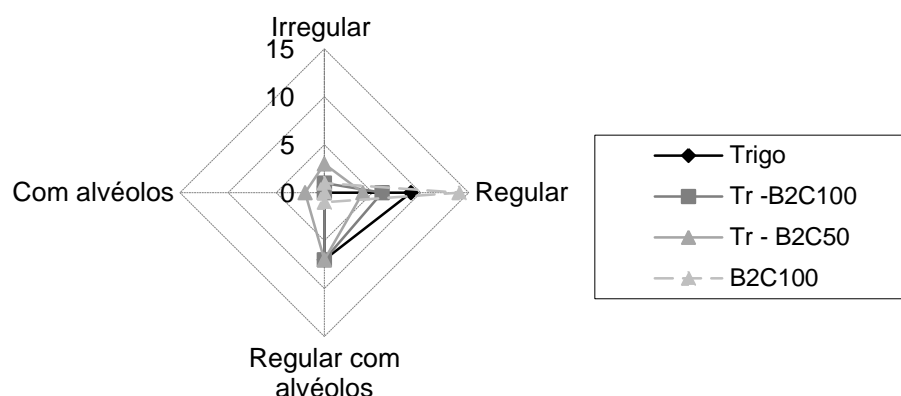


Figura 4.33: Atributos para o poro do miolo.

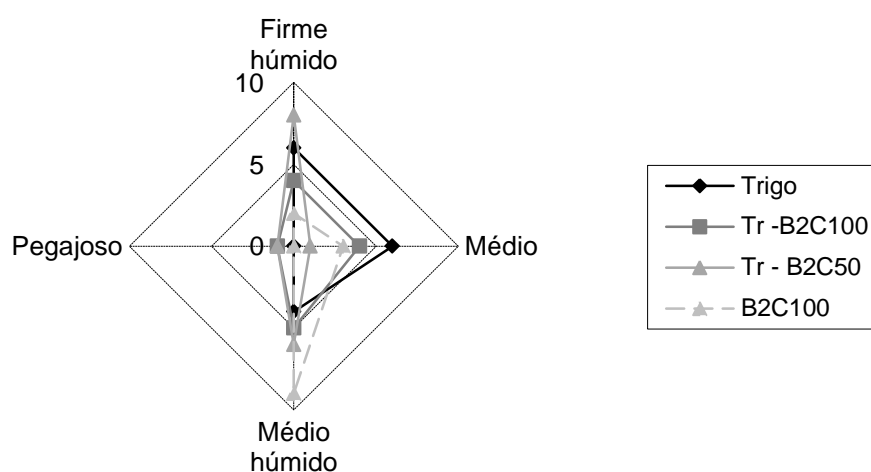


Figura 4.34: Atributos para a humidade do miolo.

Por análise dos gráficos, verifica-se os seguintes atributos dos pães:

O pão de mistura com bolota B2C100 apresentou um volume e cor da crosta normal. A humidade mostrou ser médio húmido.

O pão de mistura com bolota B2C50 apresentou volume normal a achatado e cor da crosta pouco escura. A humidade mostrou ser médio húmido.

Os dois pães de mistura mostraram ter uma textura ao corte firme normal e o poro do miolo apresentou ser fino médio e regular com alvéolos.

O pão de bolota B2C100 apresentou um volume achatado, cor da crosta escura, poro do miolo foi regular e fino. Relativamente à humidade foi médio-húmido. O pão esfarela-se ao corte.

4.10 Prova organoléptica

A tabela 4.14 apresenta os resultados da prova de aceitação com escala hedónica para os 4 tipos de pão elaborados.

Tabela 4.14: Resultados da prova de aceitação com escala hedónica para os 4 tipos de pão elaborados.

Atributos	Trigo	Trigo-Bolota B2C100 (9:1)	Trigo-Bolota B2C50 (9:1)	Bolota
Extremamente desagradável	-	-	-	4
Muito desagradável	-	-	-	5
Desagradável	-	-	-	3
Pouco desagradável	-	1	3	2
Indiferente	1	3	2	-
Pouco agradável	2	5	7	-
Agradável	10	6	3	1
Muito agradável	1	-		-
Extremamente agradável	-	-		-

A figura 4.35 apresenta os atributos de aceitação das pessoas relativamente aos pães.

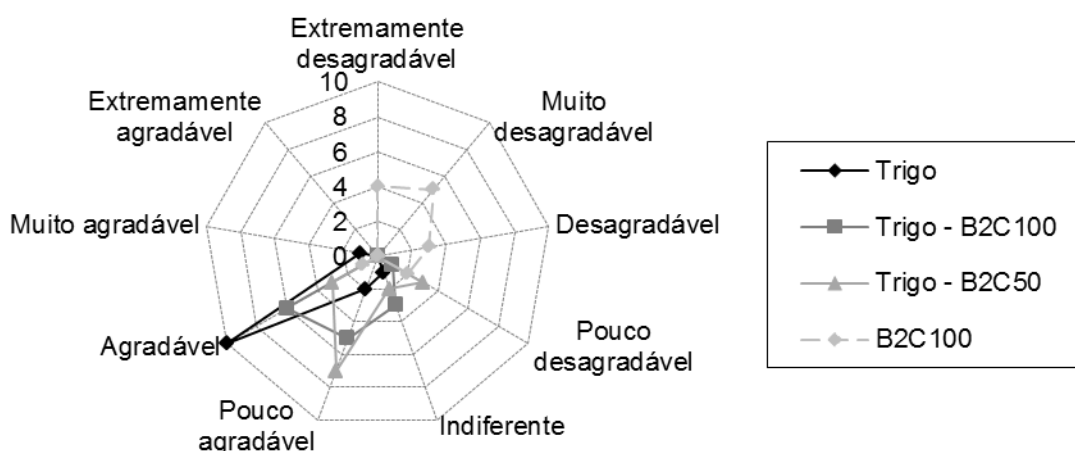


Figura 4.35: Atributos da prova de aceitação.

O pão com maior aceitação foi o de trigo, o que não é de estranhar, devido aos hábitos alimentares. Os seguintes pães preferidos foram os de mistura, com uma pequena vantagem para o de bolota cozida a 100°C. Este facto pode ser originado, porque esta bolota possui ligeiramente mais açúcares do que a bolota cozida a 50°C. Igualmente esta última possui a pele o que poderia influir no flavor do produto.

O pão só de bolota B2C100 foi considerado, de um modo geral, desagradável (apresentou sabor forte).

Pode considerar-se que o pão de mistura trigo-bolota apresenta características organolépticas suficientes para ser produzido e que encontrará consumidores em pessoas com gosto pelos sabores diferentes e com preocupações pela conservação da sua saúde.

V. CONCLUSÕES

Através do estudo realizado verificou-se que a bolota pode ser cozida com a pele sendo suficiente 10 a 20 minutos de cozedura a 50°C, para diminuir a quantidade de taninos, sem perda de qualidade e das características necessárias para se obter uma ideal farinha para fazer pão.

A cozedura da bolota com pele proporciona:

- um processo de remoção de taninos (0.1075 µg equivalentes de ácido tânico /mg) e de açúcares (42.8 µg/mg);
- a preservação de uma quantidade significativa de polifenóis (5.7 µg equivalentes de ácido tânico /mg) e um aumento da actividade antioxidante (21.0 µM equivalentes de Trolox /mg) de amostra seca;
- o aumento da digestibilidade proteica (13.90 %).

O facto de ser possível processar uma bolota com pele, ou seja sem o 2º descasque é um factor positivo sob o ponto de vista do processamento industrial, pois torna o processo pouco dispêndioso. Igualmente a relação tempo/temperatura de cozedura da bolota para remoção dos taninos é favorável sob o ponto de vista energético.

Após a redução dos taninos pode proceder-se à conservação da bolota por congelamento, como se faz à castanha, para posterior utilização em diversas aplicações.

De forma a conservar a bolota doce por um longo período de tempo de prateleira, pode recomendar-se o processo de congelamento, uma vez que a bolota se conservou relativamente bem em congeladores num período de 12 meses.

A prova de panificação mostra que a bolota da 2ª cozedura a 100°C, sem pele, comportou-se de modo semelhante à bolota da 2ª cozedura a 50°C, com pele. Estas farinhas mostraram um bom e estável crescimento do pão.

O processo de cozedura da bolota doce recomendado é apresentado na figura seguinte.

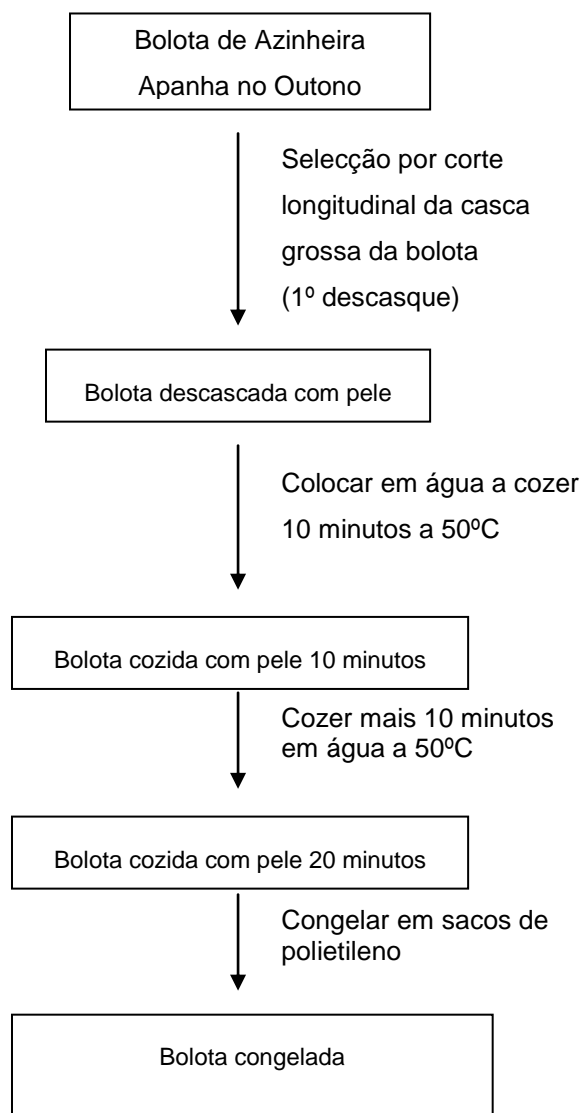


Figura 5.1: Fluxograma do processo de cozedura da bolota doce.

Assim a bolota congelada, é um ingrediente que pode ser usado nas mais diversas receitas da alimentação humana. Poderá fazer-se com a bolota congelada, farinha num moinho de lâminas para pão, bolo, sopa, doce, queijinhos de bolota, azevias etc.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho serviu para analisar os componentes e avaliar a acção antioxidante dos componentes da bolota e a digestibilidade proteica da bolota doce da Azinheira *Quercus rotundifolia*.

Este trabalho pretende estimular as pessoas e a indústria alimentar a preservar, a cuidar, a reflorestar e a colher os frutos das Azinheiras.

Será preciso colher toneladas de bolota, proceder ao tratamento recomendado neste trabalho e congelamento de modo a abastecer o mercado exigente. Numa feira realizada este ano no Alentejo, o pão de bolota foi um sucesso, a padaria não conseguiu ter matéria-prima necessária para dar resposta ao mercado.

Na área da biotecnologia, a manipulação genética das azinheiras e carvalhos, pode levar à obtenção de árvores que produzam bolotas com características mais de acordo com o que a indústria alimentar pretender.

VII. BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, J. A. A., (1986) Influência dos taninos de frutos de *Quercus ilex* L. e *Quercus suber* L. sobre a fermentação retículo – ruminal e a digestão enzimática das proteínas, Tese de Mestrado, Universidade de Évora, 323.

ALMEIDA, J.A.A. & Marinho, A.A.M. (1992) Valor Nutritivo da Bolota e da Lande. II Colóquios sobre el Cerdo Mediterráneo, 9 -10.

ANDRÉO, Y.; Nakagawa, J. ; Barbedo, C.J., (2006) Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Pennington), Revista Brasil. Bot. 29, 2: 309-318.

ARRANZ, S; Saura-Calixto, F; Shaha, S; Kroon, P.A; Saura-Calixto, F.; Shaha, S.; Kroon, P.A., (2009). High Contents of Nonextractable Polyphenols in Fruits Suggest That Polyphenol Contents of Plant Foods Have Been Underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57** (16): 7298. [doi](https://doi.org/10.1021/jf9016652) : 10.1021/jf9016652 . [PMID 19637929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19637929/) .

ARTS, I.C.; Hollman, P.C., (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition* **81** (1 Suppl): 317S–325S. [PMID 15640497](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15640497/) .

BALLESTER, C., Caballero, S., Garcia, L., Giese, H., Höfling, A., Höltekemeier, K., Möhlmann, M., Pastor, J.M., Plassmann, H.-W., Renkamp, A., Schulte, H.-G. (1995) Qualitätssicherungs-systeme in der Lebensmittelproduktion. Unterrichtsbausteine su ISO 9000 und HACCP. Arbeit und Leben DGB/VHS NW e.V. Bielefeld.

BATTESTIN, V.; Matsuda, L.K.; Macedo, G.A., (2004) Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alim. Nutr.*, Araraquara, **15** (1): 63-72.

BÄRLOCHER F.; Graça M.A.S. (2005) Total phenolics. *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*, 97 – 100.

BARTOLOMÉ, B., Jiménez-Ramsey, L.M., Butler, L.G., (1995) Nature of the condensed tannins present in the dietary fibre fractions in foods. Food Chemistry, Barking 53, **4**: 357-362.

BENDER D. A., (2005). A Dictionary of Food and Nutrition. Oxford University Press.

BHAT, K.T.; Singh, B.; Sharma, P. O., (1998) Microbial degradation of tannins – A current perspective. Biodegradation, **9**: 343-357

BRESSANI, R., Elías, L.G., Braham, J.E., (1982) Reduction of digestibility of legume proteins by tannins. Journal of Plant Foods 4, **1**: 43-55.

BRESSANI, R., (1983) Research needs to up-grade the nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition, Netherlands, **32**: 101-110.

BUTLER, L.G., (1989) Effects of condensed tannins on animal nutrition, Hemingway, R.W.; Kerchesy, J.J. (Ed.). Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum Press. New York: 391-402.

CANTOS, E., Espín, J.C., López-Bote, C., Hoz, L., Ordóñez, J.A., Tomás-Barberán, F.A., (2003) Phenolic Compounds and Fatty Acids from Acorns (*Quercus* spp.), the Main Dietary Constituent of Free-Ranged Iberian Pigs. J. Agric. Food Chem. 51, **21**: 6248–6255.

CASTRO, F. C. A. M., (2009) Efeito dos taninos da bolota na digestibilidade da proteína bruta de dietas de porcos alentejanos de montanha. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

CIESLA, W. M., (2002) Non-wood forest products from temperate broad-leaved trees. Series title: Non-Wood Forest Products, 15.

CLÉMENCE, J.F., Péron, F., (1995) O carvalho “o nome de árvore”. Temas e debates. Actividades Editoriais, Lda. Lisboa.

CORREIA, P. R., Beirão-da-Costa, M. L., (2010) Chestnut and acorn starch properties affected by isolation methods. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. DOI 10.1002/star.201000003 421.

DAS S., Tyagi A.K., Kaur H., (2000) Cancer modulation by glucosinolates: A review. Current science. 79 (12), 1665–1671.

DEMIATE I.V.; Wosiacki, G.; Czelusniak C.; Nogueira, A., (2002) Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre métodos colorimétricos e titulométricos. Ciências Exactas e da Terra, C. Agrárias e Engenharias, **8** (1): 65-78.

DESPHANDE, S.S.; Cheryan, Salunke M.D.K. (1986) Tannin analysis of foods products. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **24**: 401-449.

DUBOIS, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F., (1956) Colorimetric Method for determination of sugars and related compounds. Analytical Chemistry, 28 (3): 350 – 356.

EASTWOOD, M. (2003) Princípios de nutrição humana. Medicina e saúde. Instituto Piaget. Almada.

ESTRABAN., (1997) Geografía (Hispania y Galia). Planeta DeAgostini. Buenos Aires.

FERNÁNDEZ I., Gomes, A., Moreno, P., Fernandes, P., de Pedro, E., Díaz, E., Sanchez, L. (2005) Características de las bellotas de encina (*Quercus ilex*) en diferentes zonas del valle de los pedroches (Córdoba). Inventário Bromatológico. Producciones agroganaderas: Gestión eficiente y conservación del medio natural (Vol. I) pag. 379-385. Consultado de: <http://www.serida.org/seep2005/trabajos/43.pdf> em 25 de Setembro de 2010.

FREI, B., (2009). Controversy: What are the true biological functions of superfruit antioxidants, Universidade Estadual de Oregon.

FREEMAN, J. E.; Kramer, N.W. e Watson, S.A., (1968) Gelatinization of starches from corn (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Effects of genetic and environmental factors. Crop Sci., **8**: 409 – 413.

GARCÍA, D.E., (2004). Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. Pastos y Forrajes, **27** (2).

GÓMEZ, E. G., Sieso J. P., Taboada A.R.; (2002) Aportaciones al uso de la bellota como recurso alimenticio por comunidades campesinas; Cuad. Soc. Esp. Cien. For. 14; Madrid.

GUERREIRO, M.C.G., (1994) Actividade Antioxidante do *Rosmarinus officinalis* L., Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Departamento de Zoologia, Coimbra.

HARBORNE, J. B. (1980) Plant phenolics. Encyclopedia of Plant Physiology, volume 8 Secondary Plant Products, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 329-395

HASLAM, E., (1966) Chemistry of vegetable tannins. Academic Press. London.

HASLAM, E., (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. Journal of Natural Products, **59**: 205-215.

KHANBABAEE K., Ree T., (2001) Tannins: Classification and Definition. Nat. Prod. Rep. **18**: 641–649. DOI: 10.1039/b101061I.

KOLEVA, I.I.; van Beek, T.A.; Linssen, J.P.H.; Groot, A.; Evstatieva, L.N., (2002) Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods, Phytochem. Anal. **13**: 8-17.

- LOPES, I.M.G., Bernardo-Gil, M.G., (2005) Characterisation of acorn oils extracted by hexane and by supercritical carbon dioxide. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **107**: 12 – 19. DOI: 10.1002/ejlt.200401039.
- MATA, P.; Guerreiro, M., (2010) A cozinha é um laboratório. Fonte da palavra. 3ª edição. Lisboa.
- MATOS, F. (2006) Actividade antioxidante de óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas tradicionalmente usadas na alimentação mediterrânea e comparação com os antioxidantes sintéticos usados na indústria alimentar. Relatório de estágio Engenharia Biotecnológica, Universidade do Algarve, Faro.
- MATUSCHEK, E.; Svanberg, U., (2002) Oxidation of Polyphenols and the Effect on In vitro Iron Accessibility in a Model Food System. Journal of Food Science **67**: 420. doi : 10.1111/j.1365-2621.2002.tb11421.x .
- Merck Index, (1989) 11th Edition, **4883**.
- MESQUITA, F. R.; Corrêa, A. D.; Abreu, C. M. P.; Lima, R. A. Z.; Abreu, A. F. B., (2007) Linhagens de feijão (*phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade proteica. Ciênc. agrotec., (Impr.), **31**(4): 1114-1121.
- NAKAMURA, Y.; Tsuji, S.; Tonogai, Y., (2003) Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. J. Agric. Food Chem., **51**: 331-339.
- NOZELLA, E.F., (2001) Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo.
- NUNES, C.A.P.C., (2004) Estudo de interacção entre componentes de farinha de *Sorghum bicolor* (L.) Moench, Tese de Doutoramento. Departamento de Química. Universidade de Aveiro.

Oh, H.I., Hoff J.E., Armstrong G.S., Haff. L.A., (1980) Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 28: 394-398.

OLIVEIRA, P.; Custódio, A. C.; Branco, C.; Reforço, I.; Rodrigues, F.; Varela, M. C.; Meierrose, C., (2007) Hybrids between cork oak and holm oak: Isoenzyme analysis, RDPC da Universidade de Évora.

PAREJO, I.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Rosas-Romero, A.; Flerlage, N.; Burillo, J.C., Carles, (2002) Comparison between the Radical Scavenging Activity and Antioxidant Activity of Six Distilled and Nondistilled Mediterranean Herbs and Aromatic Plants, *J. Agr. Food Chem.* **50**: 6882-6890.

PERIS JB, Studing G, Vnaglosa B. (1995) Heterósidos. *Fitoterapia aplicada*. Valencia: M.I.C.O.F: 67-8.

PIRES, C. M; Oliveira, M. G. A.; Rosa, J. C; Cruz, G.A.D.R; Mendes, F. Q; Costa, N.M.B., (2006) Digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de proteínas de alimentos: estudo comparativo. *Alim. Nutr. Araraquara*, **17**(1): 13 -23. ISSN 0103-4235

PRICE, M. L.; Butler, L. G., (1980) Tannins and Nutrition. *CRC Handbook Series in Nutrition and Food*, Section J under Naturally Occurring Food Toxicants.

PRINZ J.F., Lucas P.W., (2000) Saliva tannin interactions. *J Oral Rehabil.* **27**(11):991-994.

RE, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**: 1231–1237.

REED, J.D., (1995) Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim., Sci.*, **73**: 1516- 1528.

RODRÍGUEZ-ESTÉVEZ, V., García, A., Gómez, A.G., (2008) Characteristics of the acorns selected by free range Iberian pigs during the montanera season, Córdoba.

RODRÍGUEZ-ESTÉVEZ, V., Martínez, A. García, Moreno, C. Mata, Muñoz, J.M. Perea, Castro, A.G. Gómez, (2008) Measures and nutritional characteristics of Quercus Acorns from the dehesa, Arch. Zootec, Córdoba. 57(R): 1-12.

SALUNKHE, D.K., JADHAV, S.J., KADAM, S.S., CHAVAN, J.K., (1982) Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 17, **3**: 277-305.

SANTOS, Y. N., (1984). La economía agropecuaria en la Asturias castreña prerromana. Boletín del Instituto de estudios Asturianos **112**: 485-534.

SANZ, M.L.; Villamiel, M.; Martinez-Castro, I. (2004) Inositols and carbohydrates in different fresh fruit juices. *Food Chemistry* **87**: 325–328.

SANZ, M.L., Martínez-Castro, I.; Moreno-Arribas, M. V., (2008) Identification of the origin of commercial enological tannins by the analysis of monosaccharides and polyalcohols. *Food Chemistry* **111** (3): 778 -783.

SGARBIERI, V. C.; Antunes, P. L.; Almeida, L. D., (1979). Nutritional evaluation of four varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, Chicago, 44 (5): 1306-1308.

SPENCER, C.M., Cai, Y., Martin, R., (1988) Polyphenol complexation: some thoughts and observations. *Phytochemistry*, **27**: 2397– 2409.

SOARES, J.R., (1996) Constituição polifenólica e actividade antioxidante de extractos de *Thymus zygis* L., Universidade de Coimbra -Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Zoologia, Coimbra.

SOUSA, A., (2007) Castanha. Ministério da agricultura, desenvolvimento rural e das pescas do Centro.

STRYER, L., (1996) Bioquímica. 4.^a Edição. Standford University. Guanabara Koogan.

URQUIAGA, I.; Leighton, F., (2000) Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. Biological Research **33** (2). Chile.

VAN SOEST, J.J.G.; Benes, K.; Dewit, D.; Vliegenthart, J.F.G., (1996) The influence of starch molecular mass on the properties of extruded thermoplastic starch. Polymer **37** (16): 3543-3552.

WILLIAMS R.J., Spencer J.P., Rice-Evans C., (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. Free Radical Biology & Medicine **36** (7): 838–49. [doi](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001) : 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001 . PMID 15019969.

Anexos

Propriedades da farinha de trigo

A farinha de trigo Dona Flor® sem fermento tem as seguintes propriedades indicadas:

Composição: Farinha de trigo tipo 65 (farinha fina)

Análise: (Teores médios)

Cinzas: 0,7 %

Humidade: 14,5 %

A farinha Dona Flor sem fermento é obtida a partir da moenda de um ou mais lotes de trigo sem adição de quaisquer aditivos ou auxiliares tecnológicos. É utilizada para todos os usos culinários, especialmente nos bolos, fritos e salgados. Também é indicada para a confecção de pão branco.